THESES

présentées à

LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

pour l'obtention du titre

de DOCTEUR de l'UNIVERSITE de PARIS

(mention Sciences)

par M. **ROBILLIART Yves**

Sujet de la 1ère Thèse : RECHERCHES CYTOPHYSIOLOGIQUES SUR LE COMPLEMENT ET SUR LA FORMATION DE SA FRACTION BETA_1_C CHEZ L'EMBRYON DE POULET.

Sujet de la 2è Thèse : CONCEPTIONS ACTUELLES SUR LE ROLE DE LA BOURSE DE FABRICIUS.

Soutenues le 23 DECEMBRE 1971 devant la Commission

composée de :

Président J. André **THOMAS**
MEMBRE DE L'INSTITUT

Examinateurs André **HOLLANDE**
ASSESSEUR
Claude **ROZE**
RAPPORTEUR

S. JC. 46-01

THESES

présentées à

LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

pour l'obtention du titre

de DOCTEUR de l'UNIVERSITE de PARIS

(mention Sciences)

par M. **ROBILLIART Yves**

Sujet de la 1ère Thèse : RECHERCHES CYTOPHYSIOLOGIQUES SUR LE COMPLEMENT ET SUR LA FORMATION DE SA FRACTION BETA_1_C CHEZ L'EMBRYON DE POULET.

Sujet de la 2è Thèse : CONCEPTIONS ACTUELLES SUR LE ROLE DE LA BOURSE DE FABRICIUS.

Soutenues le 23 DECEMBRE 1971 devant la Commission

composée de :

Président J. André **THOMAS**
MEMBRE DE L'INSTITUT

Examinateurs André **HOLLANDE**
ASSESSEUR
Claude **ROZE**
RAPPORTEUR

Se. 3e. 46-04

UNIV.
LEIDEN
BIB.

A Mon Président de Thèse

Monsieur J. André THOMAS

Membre de l'Institut.
Membre de l'Académie de Médecine.
Professeur titulaire de la Chaire de Biologie et Physiologie Cellulaires de la Faculté des Sciences de Paris VI.

Qui, en suivant mon travail avec beaucoup de sollicitude, m'a aidé de ses conseils et de son autorité, et qui m'a fait le grand honneur d'accepter la présidence du Jury de cette thèse.
Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.

A Mes Juges

Monsieur C. ROZE

Professeur de l'Université. Paris VI.

Qui a accepté de faire partie de mon Jury.
Je l'en remercie vivement, ainsi que de la cordialité de son accueil.

Monsieur A. HOLLANDE

Professeur de l'Université. Paris VI.

Qui a bien voulu faire partie de mon Jury et m'apporter d'utiles critiques.
Qu'il accepte ici l'expression de ma reconnaissance.

A Monsieur NGUYEN-TRONG Thu

Docteur en Pharmacie
Docteur és Sciences
Aptitude à l'Enseignement Supérieur en Sciences
Docteur en Médecine

En qui, Monsieur J. André THOMAS, notre Maître et Président de Thèses, me fit l'honneur de choisir mon Parrain.
En se chargeant de m'instruire théoriquement, il m'a inspiré le sujet de cette Thèse.
Pédagogue exceptionnel, il ne ménagea aucun sacrifice pour convertir l'autodidacte que j'étais à l'éthique rigoureuse fruit de sa solide formation universitaire.
Chercheur différencié, il m'a laissé bénéficier de sa grande expérience de praticien et tout particulièrement dans le domaine de l'immuno-électrophorèse des protéines cellulaires.
Il m'a si courageusement aidé à réaliser cette Thèse, qu'en lui, j'ai non seulement trouvé un maître, mais aussi un ami.
Qu'il accepte ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur R. ARDRY (Centre de Recherches BIOSUL)

Membre de l'Académie de Pharmacie
Docteur en Pharmacie
Docteur és Sciences

Qui, en chimie et en immunochimie des protéines sériques et tissulaires, et plus particulièrement dans le domaine de l'immuno-électrophorèse où il oeuvra en pionnier, m'a prodigué ses précieux conseils et m'a constamment guidé en me laissant bénéficier de sa grande érudition.
Il m'a donné le goût de la recherche et m'a appris à discerner l'hypothèse de travail de celle qui doit le suivre.
Qu'il accepte ici l'expression de ma fidèle reconnaissance.

A Monsieur J. BAILLET

Professeur Agrégé. Service de Médecine nucléaire,
Hopital Broussais.
Docteur és Sciences

Qui m'a prodigué ses précieux conseils et m'a permis de bénéficier de son installation à l'Hopital Broussais.
Qu'il accepte ici l'expression de ma vive gratitude.

A Tous mes Amis

Qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

A Mes Chers Parents

Qui m'ont apporté leur soutien moral et qui m'ont permis d'entreprendre ce travail dont la présentation nécessite une riche iconographie.
Qu'ils acceptent ici l'expression de ma profonde et affectueuse reconnaissance.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556020_0006

RECHERCHES CYTOPHYSIOLOGIQUES SUR

LE COMPLEMENT

ET SUR LA FORMATION DE SA FRACTION BETA_1_C

CHEZ L'EMBRYON DE POULET.

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRES

PARIS VI

SOUS LA DIRECTION DE MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN-ANDRE THOMAS

YVES ROBILLIART

- P L A N -

INTRODUCTION

I - HISTORIQUE : Classement des études antécédentes 8

II - LES COMPOSANTS DU COMPLEMENT 22

III - OBJET DU TRAVAIL 37

-=-=-=-=-=-

PREMIERE PARTIE : MATERIEL ET TECHNIQUES

I - ISOLEMENT DU SERUM EN VUE DE PRESERVER SA FRAICHEUR 43

A - Macrotechnique classique : ponction veineuse.

B - Microtechnique personnelle.

II - PREPARATION D'ORGANES CHEZ L'EMBRYON ET AU DELA DE L'ECLOSION 54

III - TECHNIQUES D'IMMUNO-ELECTROPHORESE 66

- immuno-électrophorèse des prélèvements de sérums
- immuno-électrophorèse des broyats d'organes

IV - MESURE DE L'ACTIVITE HEMOLYTIQUE DU COMPLEMENT GLOBAL 75

A - Dosage du complément par la technique classique à 50 % d'hémolyse (ROULIER)

B - Dosage du complément par la microtechnique de VARGUES

C - Ultra-microméthode personnelle.

I - Mesure de l'activité hémolytique du complément global des prélèvements classiques.

2 - Mesure de l'activité hémolytique des prélèvements obtenus par notre micro-méthode de prélèvements.

V - PREPARATION D'IMMUN-SERUMS-ANTI-ORGANES ET D'IMMUNS-SERUMS ANTI-SERUMS TOTAUX 98

VI - TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE 106

A - INTERET
B - PRINCIPE
C - COUPES A LA CONGELATION
D - TRAITEMENT DES COUPES EN VUE DE REVÊLER L'ANTIGENE
RECHERCHE : TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE
E - OBSERVATION DES PREPARATIONS
F - TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE QUALITATIVE
G - TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE QUANTITATIVE

VII - METHODES D' ABSORPTION IMMUNOLOGIQUE OU DE MODIFICATION CHIMIQUE SUR COUPES A CONGELATION AVANT EPREUVE D'IMMUNO-FLUORESCENCE 135

A - avec hydrazine
B - avec sérum anti-thymus
C - avec sérum anti-bourse de Fabricius
D - avec sérum anti - IG poule.

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX

I - SENSIBILITE DE L'ULTRAMICROMETHODE DE DOSAGE DU COMPLEMENT 143

A - sur sérum de cobaye
B - sur sérum de poulet

II - IDENTIFICATION IMMUNOELECTROPHORETIQUE DE LA FRACTION BETA-I-C SUR SERUMS ET DANS LES DIFFERENTS EXTRAITS D'ORGANES CHEZ L'EMBRYON DE POULET 150

A - sur prélèvements à partir des ponctions veineuses classiques
B - sur prélèvements obtenus par notre microméthode
C - sur différents extraits d'organes chez l'embryon de poulet.

III - CARACTERISATION DE LA FRACTION BETA-I-C SUR COUPES A CONGELATION D'INTESTIN D'EMBRYON DE POULET EN IMMUNO-FLUORESCENCE. 176

IV - IDENTIFICATION EN IMMUNO-FLUORESCENCE DE LA PREMIERE FORMATION IN SITU DE LA FRACTION BETA-I-C : PREMIERS ELEMENTS LYMPHOBLASTIQUES FORMATEURS DE BETA-I-C DANS LE THYMUS ET DANS LA BOURSE DE FABRICIUS : ORGANES A L'ORIGINE DE LA FORMATION DES IMMUNITES CELLULAIRE ET HUMORALE. 181

V - NEGATIVATION DE LA FLUORESCENCE SPECIFIQUE 200

A - avec Hydrazine
B - avec sérum anti-thymus
C - avec sérum anti-bourse de Fabricius
D - avec sérum anti-IG de poule

VI - COMPARAISON DES CINETIQUES DE FORMATION DE BETA-I-C GLOBULINE PAR MESURE DE LA DENSITE DE POPULATION CELLULAIRE BETA-I-C FORMATRICE DANS LE THYMUS ET DANS LA BOURSE DE FABRICIUS DEPUIS SON APPARITION CHEZ L'EMBRYON JUSQU'A LA MATURITE SEXUELLE OU CES DEUX ORGANES LYMPHO-EPITHELIAUX COMMENCENT LEUR INVOLUTION 207

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE

-=-=-=-=-=-=-=-

Ier CHAPITRE

I - DIFFERENCE ENTRE SPECIFICITE D'ESPECE ET SPECIFICITE DU "MOTIF BETA-I-C" 213

II - VALIDITE DE LA SPECIFICITE BETA-I-C DANS DIFFERENTES ESPECES 215

2ème CHAPITRE

I - CONCEPTION ACTUELLE DE L'IMMUNITE HUMORALE ET DE L'HYPERSENSIBILITE RETARDEE 216

II - ROLE DES LIGNEES LYMPHOCYTAIRES DANS L'IMMUNITE HUMORALE ET L'HYPERSENBILITE RETARDEE 218

III - PREMIERE SECRETION DE BETA-I-C THYMO ET BURSO DEPENDANTE DISCUSSION DES DEUX THEORIES : "COLONISATION HUMORALE" ET "COLONISATION CELLULAIRE" 222

-=-=-=-=-=-=-=-

CONCLUSION 224

-=-=-=-=-=-=-=-

BIBLIOGRAPHIE 228

I N T R O D U C T I O N

Le complément est un système enzymatique très complexe se trouvant parmi les protéines sériques, dont la Bêta-1-C globuline est la plus importante fraction.

Nos recherches cyto-physiologiques du complément total seront basées sur la mise au point d'une ultra-micro méthode de dosage rapide et précis de ce complexe (altérable par vieillissement).

Pour étudier la première formation de sa fraction Bêta-1-C, nous nous baserons sur les techniques d'immuno-électrophorèse et d'immuno-fluorescence exécutées avant et après absorption immunologique ou modification chimique des sites antigéniques faites sur les premières cellules Bêta-1-C formatrices.

Mais avant de voir en détail l'objet de ce présent travail, faisons rapidement le rappel des études antécédentes et celui des composants du complément.

I - HISTORIQUE : Classement des études antécédentes.

La découverte du complément est liée à celle de l'activité bactéricide du sérum et au concept d'une immunité humorale.

Le concept d'une immunité exclusivement humorale n'a pu naître avant la notion d'une immunité cellulaire mise en évidence dès I882 par les recherches de METCHNIKOFF sur la phagocytose. Car, en I875, LANDOIS ayant remarqué le pouvoir hémolytique du sérum vis-à-vis des érythrocytes de certaines espèces animales, lesquels ne parviennent au contact de sérum étranger que dans des circonstances artificielles, comment aurait-il pu attribuer au sérum un pouvoir cytotoxique général ? (LANDOIS I875)

En I875, LANDOIS ignore que le sérum de rat exerce une influence destructrice frappante sur le microbe du charbon (BEHRING I888) que le sang défibriné de divers animaux

./..

est bactéricide pour un certain nombre de germes et que cette propriété disparaît après chauffage à 55° C (NUTTAL I888).

C'est BUCHNER qui, de I889 à I894, s'appuyant sur les travaux de ces précédents auteurs, et parce qu'il a l'idée de tester, après chauffage du sérum à 55° C, son pouvoir bactéricide mais aussi son pouvoir hémolytique, attribuera à un même principe sanguin thermolabile les deux pouvoirs. Cet auteur démontre que ce pouvoir bactéricide entrevu par BEHRING et NUTTAL appartient au sérum, exempt d'éléments cellulaires et qu'il s'agit d'un pouvoir cytotoxique général; que les érythrocytes appartenant à des organismes différents y sont particulièrement sensibles, et surtout que le pouvoir bactéricide, comme le pouvoir hémolytique sont détruits par chauffage à 55° C.

BUCHNER désigne par le nom d'ALEXINE (αλεξε ν = défendre) le principe sanguin qui provoque la destruction des bactéries et des globules rouges étrangers. (BUCHNER H.1889)

Est-ce ainsi que prit naissance le concept d'une immunité exclusivement humorale ?

C'est le cas si l'on entend par "immunité exclusivement humorale " la protection que confère à l'organisme l'alexine de BUCHNER in vivo, qu'on isole du sang en isolant le sérum, et qu'on

...

met en contact de cellules ou de germes étrangers pour reproduire in vitro ce qu'on observe in vivo dans le sang d'un organisme "neuf".

Parce qu'alors l'alexine de BUCHNER agirait dans le sérum exempt d'éléments cellulaires. Mais surtout parce que ce sérum-là serait exempt"d'anticorps " , donc agirait de façon non spécifique sur les érythrocytes observés par LANDOIS. Car en I893, si la vibriolyse (ou phénomène de PFEIFFER) n'était pas encore connue, la notion d' anticorps était déjà née. En effet: dès I880, PASTEUR prévoyait le rôle vaccinant des toxines bactériennes dont il faisait la première découverte sur culture de bacille de choléra des poules (Pasteurella septica ou multicida); le filtrat de culture, en l'absence de toute bactérie vivante, reproduisit une partie de la symptomatologie. (PASTEUR 1880)

Dix ans plus tard, VON BEHRING et KITASATO démontraient le pouvoir antigénique des toxines: le sérum d'animaux immunisés avec une toxine étant capable de neutraliser celle-ci grâce à la présence d'anticorps antitoxiques (VON BEHRING 1890)

Avant I894, par "anticorps" , il fallait entendre : réponse à des toxines injectées seules; les anticorps en réponse à des injections de germes ou de cellules étrangères, n'étant pas encore connus.

...

I894 : PFEIFFER, s'il apporte une véritable démonstration expérimentale de " l'immunité humorale ", la définit cette fois par rapport à l'élaboration d'anticorps " circulant ", et non par rapport à l'alexine de BUCHNER.

Vibriolyse ou phénomène de PFEIFFER.

Les vibrions cholériques provoquent une septicémie rapidement mortelle lorsqu'ils sont inoculés au cobaye par voie péritonéale. Mais introduits sous la peau, ils sont assez bien tolérés et, après deux ou trois injections, l'animal est protégé à l'égard d'une inoculation intra péritonéale virulente.

PFEIFFER, étudiant le mécanisme d'une telle immunité, constate que les vibrions injectés dans le péritoine des cobayes préparés, présentent à l'examen du péritoine (quelques minutes après l'injection intrapéritonéale) des transformations radicales. A la place des bâtonnets incurvés et mobiles, à gram négatif, introduits, on ne retrouve que des granules sphériques, immobiles, ayant perdu en partie leur affinité tinctoriale. Ces grains, comme devait le montrer METCHNIKOFF, sont englobés par les phagocytes et disparaissent rapidement comme s'ils avaient été dissous dans l'exsudat péritonéal.

...

La vibriolyse, ou plus exactement la transformation granulaire du vibrion, est un processus spécifique consécutif à l'élaboration d'un anticorps circulant, tant il est vrai que le sérum d'un animal préparé injecté à un animal neuf, confère à celui-ci l'immunité de celui-là. (PFEIFFER R.1894).

Quoi qu'il en soit, à partir du phénomène de PFEIFFER, l'immunité humorale,évoquée par les premiers auteurs,paraissait solidement établie.

I895 : Le complément aspécifique achève l'action de l'anticorps. Jules BORDET découvre ce rôle à l'alexine de BUCHNER. (.BORDET J. 1939)

Si, dans un immun-sérum cholérique frais, on peut assister à la désintégration granulaire des vibrions, comme dans l'exsudat péritonéal du cobaye, dans un immun-sérum vieilli ou chauffé à 55°-56°, les vibrions perdent leur aspect incurvé et sont bien immobilisés et agglutinés par l'anticorps, mais ils restent vivants et proliférants; pour restituer au sérum son activité bactériolytique, il faut et il suffit de lui ajouter une trace de sérum frais d'un animal quelconque.

...

De ces constatations, BORDET conclut que le phénomène de la vibriolyse nécessite la coopération de deux substances indépendantes : l'une stable et spécifique, l'anti-corps de vaccination, dénommée sensibilisatrice, l'autre fragile et aspécifique, constituant normal de tout sérum pour lequel, en I900, Paul EHRLICH, pour désigner"le facteur non spécifique et thermolabile nécessaire pour provoquer l'hémolyse en présence d'hémolysine, anticorps spécifique et thermostable", créa le terme "KOMPLEMENT", illustrant sa fixation par après sur le complexe hématies-anticorps, découverte qu'il partage avec MORGENROTH (EHRLICH P.1900). L'année suivante, (I90I) BORDET reprenant le sérum de LANDOIS où BUCHNER l'avait laissé, se souviendra d'un certain pouvoir agglutinant après chauffage à 55°, et montrera que l'activité globulicide naturelle de l'alexine de BUCHNER, préexiste à l'immunisation qui l'exalte (BORDET J. 1939).

Dès lors, la réaction de BORDET-GENGOU va susciter plus d'intérêt pour l'hémolyse elle-même que pour le complément dans l'immunité. C'est ainsi qu'en I905, HENRY publiera une " étude de la loi de la vitesse de l'hémolyse des hém aties de poulet par le sérum de chien " qui servira de base à la théorie mathématique des coups multiples qu'ALBERTY proposera ... 46 ans plus tard (HENRY-V.1905), (ALBERTY-R.1951).

...

Aspécifique, mais achevant l'action spécifique de l'anticorps, le complément et l'alexine sont-ils identiques ?

FERRATA ne tente pas cette analyse-là. Il va inaugurer l'analyse du seul complément hémolytique.

1907 : A. FERRATA apporte la notion de dualité du complément, une partie de son activité se trouvant d ans la fraction " globulinique ", l'autre dans la fraction albuminique du sérum.

Pour FERRATA, l'activité complémentaire du sérum de cobaye n'est pas le fait d'un corps unique, mais la résultante d'au moins deux facteurs et il le démontre :

L'auteur dialyse du sérum frais de cobaye pendant 24 heures en présence d'eau courante; il apparaît dans le dialyseur un précipité d'euglobulines (protéines insolubilisées par soustraction ionique); or, ni le précipité, séparé et redissous dans du soluté physiologique, ni le liquide surnageant ramené au taux normal en sels, n'hémolysent les érythrocytes sensibilisés, mais il suffit de mélanger les deux liquides pour retrouver l'activité complémentaire (FERRATA A.).
1907

...

I907 : BRAND, la même année, montre que les deux constituants mis en évidence par FERRATA se fixent sur l'immun-complexe dans un ordre préférentiel. En effet, l'hémolyse se produit si les érythrocytes sensibilisés sont immergés successivement dans les deux liquides,à condition de commencer par la solution d'englobuline.

Le premier constituant du complément est donc celui qui précipite dans le dialyseur; il fut désigné depuis par le symbole C'_1 ou M (Midpiece-Mittelstuck) chaînon moyen ou intermédiaire. Le second constituant contenu dans le liquide surnageant fut désigné par C'_2 ou E (Endpiece-Endstuck) chaînon terminal. (BRAND 1907).

Les deux chaînons C'_1 et C'_2 sont thermolabiles à 55°-56° et détruits par les ferments protéolytiques.

En I9I2, RITZ constate que le pouvoir alexique du sérum frais aboli par du venin de cobra est aisément rétabli par addition d'un sérum chauffé à 55° pendant quelques minutes; ceci implique l'existence d'un troisième facteur, sensible au venin, mais thermostable (RITZ 1912). Ce n'est qu'en I925 que, parce qu'il est inhibé aussi par certaines bactéries (B.prodigiosus) et par la levure ou plus précisément par le zymosan, cénapse à

...

prédominance polyosidique isolée de la paroi de la levure, que WHITEHEAD, GORDON et WORMALL, identifieront le "C'_3". (WHITEHEAD, H.R.-1925).

Le constituant C'_3, au cours de la séparation de C'_1 et de C'_2 se retrouve avec l'une et l'autre de ces fractions, mais surtout avec C'_1.

En même temps, ces auteurs identifieront, après GORDON, en 1924, un quatrième facteur : C'_4. Si, à un sérum frais de cobaye, décomplémenté par l'ammoniac, on ajoute un sérum chauffé à 55° pendant quelques minutes et traité par le venin, on retrouve l'activité complémentaire.

La conclusion s'impose : il existe un quatrième composant sensible à l'ion NH_4^{++} et thermostable. (GORDON J. 1926).

En 1932, DA COSTA CRUZ entrevoit l'existence de deux constituants de C'_3 (DA COSTA CRUZ J. 1932).

Ces observations resteront les éléments de base essentiels pendant 30 ans, la découverte de l'activité globale du système apparaissant de plus en plus complexe. Aussi les premières"analyses" de sérum, en vue d'isoler le complément puis ses composants, aboutissent davantage à créer plus qu'à

./...

découvrir, les sous-systèmes, fractions ou séquences dont la signification n'apparaît pas dépasser beaucoup le cadre étroit de la réaction d'hémolyse in vitro.

Quoi qu'il en soit, à partir de cette époque, il semble possible de définir le complément comme un système comprenant quatre fractions. Mais, la définition, pour être valable, doit relier les phénomènes divers où le complément se manifeste. Or, il semble qu'on attende de l'isolement, puis du dénombrement de fractions, ou de séquences d'activité dans le phénomène lytique, la clé de l'étude des autres phénomènes (même si tous les éléments définis par la suite, nécessaires à la lyse d'érythrocytes ou de bactéries, ou de cellules nuclées, sensibilisés, ne s'avèrent pas indispensables ou identiques aux fractions sériques qui interviennent dans l'organisme pour la production d'anticorps, par l'intermédiaire de la phagocytose aspécifique, ou pour sa défense à travers des processus humoraux directs n'impliquant pas de réponse spécifique).

La biochimie du complément et ses applications en sérologie vont reposer sur les tentatives de fractionnement et d'isolement puis sur l'identification précise des protéines sériques impliquées dans l'immune-hémolyse. Dès I938, UENO, cité par la suite par Manfred M.MAYER dans : " Mecanism of haemolysis by complement (MAYER MM .), marque un tournant dans l'approche

1965

...

du phénomène hémolytique par l'analyse des réactions intermédiaires. (UENO-S. 1938).

En I964, lors du symposium sur le complément, tenu en mai à LONDRES, M. M.MAYER tenta de définir le complément en terme de biochimie. On retrouve néanmoins la démarche mentale de Jules BORDET qui, dès I895, appréhenda le premier le complément dans un contexte dynamique.

Le grand mérite de BORDET est d'avoir montré que cette activité globulicide naturelle était exaltée par l'immunisation. Autrement dit, BORDET voit une différence de degré,et non de nature, entre l'activité globulicide ou "germicide" (donc défensive) du sérum frais et son activité "complémentaire" dans une réaction antigène-anticorps.

Il présente l'activité aspécifique anti-antigène du sérum in vivo qu'il attribue à l'alexine de BUCHNER, comme la réaction immune-humorale de base: réaction qui est due à un facteur aspécifique, mais qui peut être"exaltée" par la présence d'un facteur spécifique si l'organisme a déjà rencontré l'antigène.

" L'alexine " de BUCHNER, se manifestant in vivo avant le "Komplement " d'EHRLICH, l'anticorps est le véritable facteur complémentaire et dynamisant de la réaction antigène-complément.

...

Cette leçon semble cependant avoir été quelque peu oubliée, tant il apparaît aujourd'hui encore que le " Komplement " de Paul EHRLICH a prév alu plus encore dans l'esprit qu'à la lettre à " l'alexine " de BUCHNER. Pourquoi ?

I°- Parce que si l'on doit aux recherches de METCHNIKOFF la mise en évidence d'une immunité cellulaire à travers son étude de la phagocytose, c'est à PFEIFFER que l'on doit d'avoir assis la notion complémentaire d'immunité humorale sur la transformation granulaire du vibrion par un processus spécifique consécutif à l'élaboration d'un anticorps circulant: tant il est vrai que le sérum d'un animal préparé, injecté à un animal neuf, confère à celui-ci l'immunité de celui-là;

2°- Parce que METCHNIKOFF réintervient pour montrer le rôle du phagocyte, mais après la transformation granulaire;

3°- Enfin, parce que BORDET lui-même, mettra en évidence la rôle du complément dans la mort granulaire des vibrions cholériques avec arrêt de leur prolifération, ce qui n'intervient pas dans un immun-sérum chauffé à 56° ou vieilli où l'on peut voir que la réaction s'arrête alors à l'immobilisation avec perte de l'aspect incurvé et surtout à l'agglutination par l'anticorps

...

des vibrions cholériques. Ainsi la notion d'immuno-réaction humorale initiale, restera davantage liée à la première réponse anticorps qui, en réalité, devrait être considérée comme secondaire à l'action de l'alexine, quelles que soient ses modalités dans la finalité d'une réponse défensive efficace.

Le complément pré-existe dans l'organisme à "l'agression" initiale de l'antigène, alors que les anticorps spécifiques pré-existent seulement à une seconde " agression " du même antigène.

Quoi qu'il en soit du cheminement de la pensée lors de la découverte des activités physiologiques attribuées à un complément de plus en plus complexe, mais de mieux en mieux défini par sa biochimie au fur et à mesure de l'analyse des modalités de son action, la grande majorité des investigations initiales a trouvé des applications en sérologie et en bactériologie. Et, au regard de leur grande utilité, elles ont permis à l'utilisation empirique du sérum de cobaye de prendre le pas sur les recherches fondamentales.

Aussi, peu de travaux de physio-pathologie, d'embryologie, médicales, et encore moins de physiologie cellulaire, nous renseignent sur l'origine du complément dans l'ontogénèse, (Day N.K.-1970) ; (Day N.K. 1969).

...

la phylogénèse, ou sur quelques-unes de ses fractions communes aux vertébrés supérieurs, et même aux vertébrés inférieurs comme aux vertébrés supérieurs. (JANSEN J.A. 1969).

Les recherches s u r la synthèse de fractions ont surtout porté sur leur lieu de formation : organes (foie), cellules (phagocytes) chez l'adulte, mais plus r arement chez l'embryon.

Et surtout, ces recherches sont encore trop exclusivement biochimiques: elles ne portent pas assez sur la physiologie du système complément qui se définirait d'abord à travers sa formation commune à la plupart des vertébrés,laquelle se situerait par rapport à l'établissement des deux systèmes de l'immunité, à savoir : immunité cellulaire et immunité dite " humorale ", le complément ayant surtout été appréhendé à travers les manifestations de cette dernière, mais rarement à la charnière des deux, et encore moins à leur origine commune.

A la lumière des connaissances acquises au sujet des cellules formatrices de certaines fractions du complément, comme à l'aide de celles qui concernent les organes producteurs de lignées immuno-compétentes " respec tives " et avec les hypothèses

...

déjà formulées pour expliquer la thymo-dépendance de certaines fonctions cellulaires impliquant l'intervention d'un complément physiologique, distinguées d'autres fonctions dites "burso-dépendantes" où le complément des sérologistes conditionne les réactions humorales immunes, nous définirons l'objet de notre travail.

Mais avant, il convient de rapporter ici les acquisitions au sujet de la biochimie du complément au fur et à mesure de sa découverte.

o

o o

II - LES COMPOSANTS DU COMPLEMENT

Le composant C'_1

Isolé, en 1941, à partir du sérum de cobaye par PILLEMER, ECKER, ONCLEY et COHN (PILLMER.L. 1941) puis, en 1956, à partir du sérum humain par LEPOW, RATNOFF et ROSEN, C'_1 sera identifié en 1959 comme étant un proenzyme actif nécessaire à la fixation ultérieure de C'_4 et de C'_2 sur le complexe antigène-anticorps (LEPOW I.H. 1959) ; (BECKER E.L.1959

Déjà, de 1953 à 1955, LEPOW et LAPORTE isolent trois composants n'ayant chacun par lui-même aucun pouvoir hémolytique et qui, en présence de calcium se réunissent pour former un

complexe macromoléculaire dont les propriétés sont celles de C'_1 :

C'_{1q}, nécessaire à la fixation de C'_1 sur le complexe antigène-anticorps,

C'_{1r}, qui rend C'_1 thermolabile en l'absence de Ca^{++} et C'_{1s}, initiant la conversion de C'_1 en C'_1 - estérase. (LEPOW I.H. 1953 ; LAPORTE.R. 1955).

De 1956 à 1958, LEPOW, RATNOFF, ROSEN, PILLEMER et LEVY, découvrent le processus autocatalytique de la transformation en enzyme de la pro-estérase, forme "in vivo" de la C'_1-estérase non fixée sur le complexe antigène-anticorps : après fixation sur le complexe antigène-anticorps, C'_1 devient C'_1 - estérase (ou C'_{1a}). (LEPOW I.H. 1956) ;(LEPOW I.H. 1958).

$$C'_{1q} + C'_{1r} + C'_{1s} \xrightarrow{Ca^{++}} C'_1$$

$$C'_1 + \underset{(SA)}{\text{complexe antigène-anticorps}} \longrightarrow SAC'_{1a}$$

LEPOW, NAFF et PENSKY, en 1965, rapporteront qu'ils ont pu précipiter du sérum, en même temps que la macromolécule de C'_1 qui s'active en estérase, un constituant séparé qui est l'inhibiteur de l'estérase et la maintient à l'état de proenzyme.

/....

Cet inhibiteur est associé à la macromolécule de C'_1. C'est une α 2-globuline qui, isolée et injectée au lapin, provoque l'apparition d'anticorps anti-inhibiteurs décelés par la méthode de double diffusion d'OUCHTERLONY. Après isolement et purification, cet anticorps bloque l'activité estérolytique de $C'_{1\,a}$, et ainsi sa capacité d'interaction ultérieure avec les deux composants C'_2 et C'_4 (LEPOW I.H. 1965).

L'ensemble de ces travaux a permis à LEPOW et à ses collaborateurs de définir C'_1 comme un système composé du facteur lui-même à l'état de proenzyme, de l'enzyme à l'état actif ou $C'_{1\,a}$ (C'_1 - estérase) et enfin de l'inhibiteur de l'estérase.

En 1967, MORSE confirme la nature macromoléculaire de C'_1 humain. (MORSE J.H. 1967).

Par son affinité pour l'anticorps, le C'_{1q} constitue le lien fonctionnel entre l'anticorps et le système du complément. Certains polynucléotides de synthèse sont anti-complémentaires parce qu'ils réagissent avec le C'_{1q} (YACHNIN.S. 1964).

./...

/LE COMPOSANT C'_4/

Nous l'avons vu, dès 1926, son existence ne fait plus de doute. Mais il faut attendre 1942 avec PILLEMER, SEIFTER, CHU et ECKER (PILLEMER L. 1942), puis 1957 avec LAPORTE et ses collaborateurs (LAPORTE R. 1957) et surtout 1960 avec KLEIN (KLEIN P.G. 1960), pour situer l'action de C'_4 entre celle des premier et second composants dans le mécanisme d'action du complément hémolytique.

De même, C'_4 ne sera isolé sous forme de globuline purifiée qu'en 1963. Et, comme cette pseudo-globuline migre à l'électrophorèse en gel d'amidon dans la zone des β - globulines (ZIMMER.M.I. 1960), de ZIMMER, GRABAR et BURTIN (GRABAR - P. 1960), MULLER-EBERHARD et BIRO peuvent alors, après immuno-électrophorèse, la situer en β 1_E (MULLER-EBERHARD H.I. 1963) par rapport à un arc beaucoup plus dense que MULLER-EBERHARD retrouve (MULLER-EBERHARD H.J. 1960) en β 1_C si le sérum est frais et en β 1_A si le même sérum est vieux.

BECKER avait montré que C'_4 pour fournir ensuite à C'_2 un site d'amarrage au complexe en présence d'ions Mg^{++}, intervient dès la formation de $C'_{1\,a}$-estérase qui conditionne sa fixation première au complexe antigène-anticorps (BECKER - E.L. 1960).

En 1965, MULLER-EBERHARD et LEPOW nuanceront quelque peu cette explication : pour eux, C'_{1a} - estérase, parce qu'elle

modifie la molécule C'_4, la fixe en $SAC'_{1a.4}$ et la rend d'autre part apte à se lier à la molécule de C'_2 présente :

$$SAC'_{1a} + C'_4 \xrightarrow{C'_2} SAC'_{1a.4} + C'_2$$

les ions Mg^{++} présents dans le milieu vont alors complexer la relation "$SAC'_{1a.4} + C'_2$" en "$SAC_{1a.4.2}$ prêt à fixer C'_3" : le C'_4 est ainsi un substrat de C'_{1a} (MULLER-EBERHARD H.J. 1965).

Son isolement par chromatographie a été réalisé en 1965 par BORSOS et RAPP (BORSOS.T 1965) sur colonne de Séphadex.

Le composant C'_2

En 1941, PILLEMER, ECKER, ONCLEY et COHN, isolèrent aussi C'_2 du sérum de cobaye (PILLEMER.L. 1941).

En 1949, SEIFTER, DOZOIS et ECKER réussissent à l'isoler et à le préparer à l'état purifié (SEIFTER.S. 1949).

En 1965, BORSOS et RAPP l'isolent par chromatographie sur colonne de Séphadex lors des recherches ayant pour but

/....

d'estimer le poids moléculaire des différents constituants du complément (BORSOS.T. 1965). LEPOW, TODD, SMINK et PENSKY (LEPOW I.H. 1965) POLLEY et MULLER-EBERHARD (POLLEY M.J. 1965) retrouvent eux aussi C'_2 dans la zone des β - globulines.

Cette protéine C'_2 qui migre à l'électrophorèse en position β, a une concentration sérique voisine de 10 μg/L (MULLER-EBERHARD-H.J. 1968), ce qui explique la difficulté de révèler un arc lui correspondant en immuno-électrophorèse.

Les modalités de fixation du composant C'_2 ont été particulièrement étudiées par BORSOS, RAPP et MAYER (BORSOS-J.1961 dès 1961. En 1966, SITOMER, STROUD et MAYER étudieront plus particulièrement les rôles de l'ion Mg^{2+} et la réversibilité de la liaison $EAC'_4 - C'_2$ (SITOMER,Y. 1966) : Aussi, "l'activation du pouvoir hémolytique de certains sérums par les sels de magnésium", remarquée par le CERNOVODEANU et HENRI (CERNOVODEANU.P. 1906), en 1906 (avant même que FERRATA apporte la notion de dualité du complément) reçoit-elle une explication sinon physiologique du moins biochimique 60 ans plus tard.

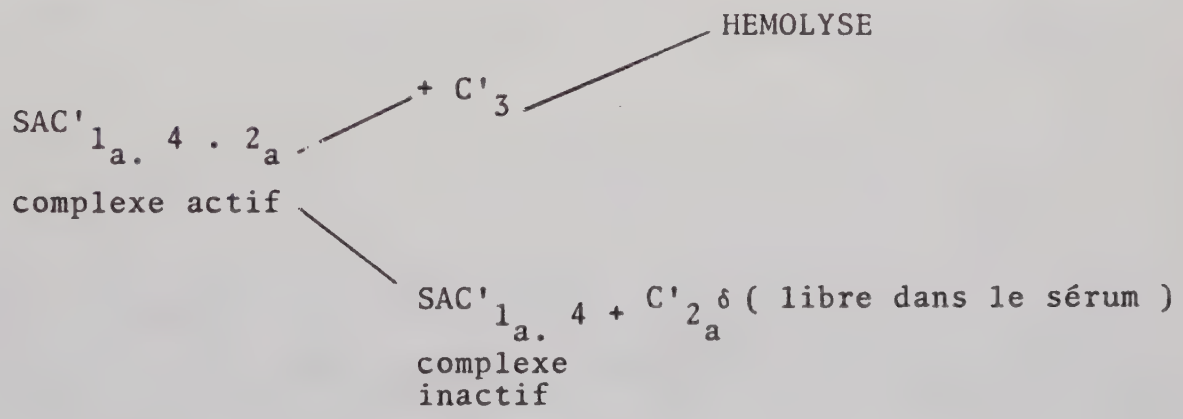
Les deux étapes proposées par SITOMER, STROUD et MAYER peuvent se résumer ainsi :

$$SAC'_{1a.4} + C'_2 \xrightarrow{Mg^{2+}} SAC'_{1a,4,2a} + C'_{2i}\ (\text{libre dans le sérum})$$

/....

Si, à ce moment, n'intervient pas la fixation du composant $^{\beta}{}_1C$, le complexe formé se dissocie par transformation de C'_2 en $C'_{2_a}{}^{\delta}$, de propriétés différentes de C'_2 et de C'_{2_a} , que l'on retrouve comme le C'_{2_i} dans le milieu ambiant.

A ce stade intermédiaire, le complexe $SAC'_{1_a,4,2_a}$ est devenu $SAC'_{1_a,4}$ et est inactif, comme le montre ANDRE avec le schéma suivant :



Cet état intermédiaire ou " Decay " du complexe fut particulièrement étudié par KABAT et MAYER qui étaient arrivés à la conclusion qu'à ce stade de la fixation des différents éléments du complément, il existe une compétition entre la vitesse de transformation de C'_2 , phénomène rapide, et la fixation de C'_3 , phénomène lent. De plus, la stabilité du

...

complexe est fonction de la température et de la quantité de C'_2 et de C'_3 en jeu (KABAT-E.A.1961).

Le Composant C'_3 (Bêta-1-C-globuline)

Soit : 1)

Le système décisif C'_3, quatrième et dernière séquence globale dans la cinétique de fixation du complément cytolytique.

ou : 2)

La globuline $\beta_1 C$ (C'_3) de MULLER-EBERHARD.

-=-=-=-=-

Il y a en effet deux conceptions différentes concernant la nomenclature des facteurs se fixant après C'_2 :

La première découle de la notion de C'_3 classique comme fraction terminale qui va du complexe intermédiaire $SAC'_{1a\ 4,2_a}$ jusqu'à la lyse ; les facteurs découverts par la suite sont alors considérés comme sous-facteurs de ce C'_3 global.

La seconde veut distinguer la $\beta_1 C$ globuline des composants de C' qui interviennent avant et après elle.

/....

Quoi qu'il en soit, le fragment α_2D de WEST, DAVIS et FORRISTAL, obtenu soit par vieillissement du sérum ou par saturation du site B de la β_1C globuline par l'hydrazine (WEST.C.D. 1966), soit par interaction SAC'1_a 4.2 - β_{1C} ou par traitement de la β_1C par le venin de cobra, a tout particulièrement retenu notre attention lorsqu'en 1966 CARPENTER et GILL le retrouvent transformé en β_1A globuline à la suite d'une conservation prolongée (CARPENTER C.B. 1966)

En effet, ces travaux mettent la β_1C globuline à la charnière même des phénomènes observés par les pionniers du complément ; souvenons-nous des critères sur lesquels s'appuie RITZ, pour affirmer l'existence d'un troisième constituant : " Le C'$_3$ sensible au venin de cobra, mais thermostable " n'existe que dans le sérum <u>frais</u> (RITZ , 1912).

Mieux, dès 1885, Jules BORDET rend la notion d'alexine inséparable de la notion de fraîcheur du sérum : souvenons-nous que c'est seulement sur l'exsudat péritonéal du cobaye comme sur son immun-sérum cholérique <u>frais</u>, que BORDET, in vitro, peut assister jusqu'à sa phase ultime, la transformation granulaire des vibrions, au phénomène de PFEIFFER, lequel commence in vivo. Si BORDET chauffe cet immun-sérum ou le laisse vieillir,

/....

il ne peut assister qu'à la première partie du phénomène observable dont l'agglutination. Comme pour restituer au sérum son activité lytique il lui suffit d'ajouter une trace de sérum non-immun frais, d'un animal quelconque, BORDET conclut que le phénomène, pour aboutir à la vibriolyse, nécessite la coopération de deux substances. L'une stable et spécifique, l'anticorps de vaccination, est la sensibilisatrice ; l'autre, fragile et aspécifique, l'alexine de BUCHNER, est un constituant normal de tout sérum.

Souvenons-nous que dès lors les sérologistes du monde entier pourront, à leur tour, remarquer que "cette substance" n'a plus d'activité lorsque le sérum n'est plus "frais du jour".

Enfin, demandons-nous pourquoi MULLER-EBERHARD peut situer en β_1C l'arc correspondant à la précipitation immuno-électrophorétique par un anti-sérum total, "d'une protéine qui, isolée du sérum frais, possède l'activité hémolytique du C'_3, quatre ans avant de pouvoir situer en β_1E le C'_4 (MULLER - EBERHARD H.J. 1960 et 1963).

C'est que la teneur en β_1C d'un sérum, s'il est frais, est relativement grande et que la β_1C est très antigénique. Ce qui se traduit pas un arc de précipitation spéfifique bien visible. Mais c'est aussi parce que

ayant remarqué l'importance de la fraîcheur du plasma MULLER-EBERHARD s'intéresse davantage à l'arc de précipitation immuno-électrophorétique qui se déplace de $\beta_1 C$ en $\beta_1 A$ lorsque le plasma vieillit, qu'aux arcs dont la position, indépendante de la fraîcheur du plasma, peut correspondre soit aux protéines rapides de composants alexiques de moindre concentration sérique, soit aux protéines sériques indépendantes du complément.

Ainsi, depuis que MULLER-EBERHARD, NILSSON et ARONSSON ont isolé et caractérisé deux β_1 glycoprotéines plasmatiques (MULLER EBERHARD H.J. 1960) et relié (MULLER-EBERHARD et NILSON) au système du complément celle qui correspond au sérum frais (MULLER EBERHARD H.J. 1960), puis proposé (MULLER-EBERHARD) cinq ans plus tard une nomenclature des facteurs du complément (MULLER EBERHARD H.J. 1965) où la $\beta_1 C$ globuline est le C'_3 qui permet d'obtenir le SAC' $\overline{1}_a$ 4.2.$_a$.3 à partir du C'_3 classique et de SAC' $\overline{1}_a$ 4.$\overline{2}_a$, les phénomènes dont l'observation fut contemporaine de la découverte du complément et de l'immunité humorale apparaissent intimement liés à la fraîcheur des sérums et, par là, à la $\beta_1 C$ globuline plasmatique.

Et ainsi MULLER-EBERHARD et Coll. apportaient une explication aux observations faites par plusieurs auteurs lorsqu'ils avaient comparé, en immuno-électrophorèse, les arcs de précipitation des sérums frais avec ceux observés dans des

/....

échantillons de sérum vieilli (MULLER-EBERHARD H.J. 1965 - ZIMMER M.J. 1961 - GRABAR P. 1960), ou lorsqu'ils avaient (SCHULTZE, HEIDE, HAUPT) isolé entre la transférine et les α_2-globulines, une protéine qui s'est révélée être la β_1 A - globuline de MULLER-EBERHARD, mais que ces auteurs nommèrent α_3A-globuline en raison de sa mobilité intermédiaire (SCHULTZE-H.E. 1962) après électrophorèse sur papier, et pour la différencier de la β_1A de MULLER-EBERHARD qui présentait un indice de sédimentation de 7 S et une teneur en carbohydrates un peu plus faible, et de l'acide sialique (MULLER-EBERHARD H.J. 1960).

Mais nous arrivons là au point où les techniques de purifications utilisées entraînent l'isolement, à partir d'une même source de fractions un peu différentes et justifie l'effort de clarification de MULLER-EBERHARD dans sa nomenclature.

Ainsi, lorsqu'il s'agit d'érythrocytes E sensibilisés par leur anticorps spécifique S (Hémolyse) ou de cellules S sensibilisées par leur anticorps spécifique A, arrivés au stade :

$$\left.\begin{matrix} EAC'_{1_a}\,4.2._a \\ \text{ou} \quad SAC'_{1_a}\,4.2_a \end{matrix}\right) \text{ complexes instables}$$

la fixation et la transformation de C'_3 (β_1-C globuline) n'intervenant pas sur C'_{1_a}, la réaction est souvent écrite sans mentionner C'_1 :

au lieu de : $EAC'_{1_a}.\ 4.2_a + C'_3$ ou selon le cas $SAC'_{1_a}.\ 4.2_a + C'_3$

on écrit : $EAC'_{4.2_a} + C'_3$ ou $SAC'_{4.2_a} + C'_3$

Cette mise au point comportant un gros plan sur les travaux de WEST, DAVIS et FORRISTAL et sur ceux de CARPENTER et GILL, suivie d'un "flash-back" sur les travaux à l'origine de la découverte du complément, renverse volontairement l'exposé chronologique qu'on attendait à la suite de la relation des découvertes qui concernent C'_1 et C'_2 puis C'_4. Elle évite ainsi de remettre constamment en question les acquisitions dans l'exposé chronologique de la découverte des facteurs et sous-facteurs qui complètent le système, et relie l'intérêt que suscite de nos jours la Bêta-1-C globuline à l'attention soutenue dès l'origine sur la fraîcheur du prélèvement.

Nous terminerons par l'exposé des mesures que, dès 1968 (MULLER.HEBERHARD.H.J.) MULLER-EBERHARD effectue lors de son étude des propriétés physico-chimiques des composants du complément humain :

La Bêta-1-C globuline compte pour environ 64 % des protéines du complément : sa concentration sérique étant de 1200 µg/ml, alors que la concentration sérique du complément (9 facteurs) est de 1890 µg/ml.

L'ultracentrifugation préparative ainsi que l'électrophorèse préparative de MULLER-EBERHARD et de SCHULTZE nécessitant un appareillage compliqué et coûteux, STEINBUCK élabore, dès 1963, une

./....

technique de purification de la Bêta-1-C globuline, fondée sur

1) l'élimination des lipides et du plasminogène par la bentonite,
2) la précipitation de la Bêta-1-C globuline par le Rivanol R et
3) l'adjonction d'une chromatographie sur DEAE-cellulose en raison des propriétés d'absorption diffétes de nouveaux lots bentonite (STEINBUCK.M. 1963).

La teneur des sérums en Bêta-1-C globuline étant relativement élevée, 0,8 à 1,5 gr/L, STEINBUCK obtient cette protéine en assez grande quantité et peut étudier alors les transformations moléculaires de la Bêta-1-C globuline dans le sérum du donneur de sang par des techniques électrophorétiques autres que l'immuno-électrophorèse (STEINBUCK.M.1961)-(STEINBUCK. (STEINBUCK.M.1964)
M.1967).

Les résultats récents de MAYER SHIN et MILLER concernant les sous-fractions de C'_3 (Bêta-1-C) du sérum frais de cobaye rapportés au colloque de Bruges en 1967 (MAYER.M.M. 1967) cadrant mieux avec les observations sur sérums frais humain faites par STEINBUCK en 1961 et LOEB et par SMITHIES en 1955 (SMITHIES.O. 1955), la thèse initiale de MULLER EBERHARD (1960) de la formation d'un produit unique appelé alors Bêta-1-A globuline à partir de la Bêta-1-C globuline (C'_3) sera considérée par STEINBUCK en 1967 comme dépassée : "il est désormais certain que la Bêta-1-C globuline nécessitera à elle seule la mise au point d'une nomenclature spéciale" (STEINBUCK.M. 1967).

Les composants C'_5, C'_6, C'_7

Ces trois facteurs donnent au complexe antigène anticorps ayant fixé les composants C'_{1_a}, C'_{2_a}, C'_3 une stabilité qui permettra d'atteindre le stade final de la destruction cellulaire (NILSSON et MULLER-EBERHARD) (NILSSON.V.R. 1965)

C'_5 a pu être identifié comme étant une protéine désignée par le symbole Bêta-1-F. Il semble que les deux facteurs Bêta-1-F et C'_6 s'associent avant leur fixation pour permettre celle-ci. Ce n'est qu'après leur liaison au complexe que la cellule se lyserait.

On connaît peu de chose de C'_6.

C'_7 s'unirait au complexe $C'_5 - C'_6$; son rôle n'est pas encore connu avec précision.

Les composants C'_8 , C'_9

Deux facteurs interviendraient encore dans le mécanisme de l'hémolyse : C'_8 et C'_9. On arrive ainsi au stade terminal de la cinétique de fixation du complément :

$$SAC'_{1_a} . 4 . 2_a . 3 + (C'_5 - C'_6, C'_7) + C'_8 , C'_9 \longrightarrow$$

$$SAC'_{1_a} , 4, 2_a, 3, 5, 6, 7, 8, 9 \longrightarrow \text{lyse}$$

./...

Devant la complexité des résultats obtenus récemment par les différents auteurs, il convient de se poser la question de savoir si certains composants découverts ne correspondent pas, sous des noms différents, à des facteurs semblables.

En effet, si comme NELSON (NELSON.R.A. 1967)), l'on compare le moment où ces facteurs interviennent dans la réaction d'hémolyse, on constate qu'il en est bien ainsi. (ANDRE.A. 1967).

°
° °

III - OBJET DU TRAVAIL

Plus les sérums, plasmas, exsudats sont frais, plus ils contiennent de Bêta-1-C globuline, et plus l'activité complémentaire est grande : s'il est un facteur dont le taux reflète l'activité du complément global, c'est bien celui-là. Mais, s'il est un facteur du complément qui est fragile, c'est bien le même :

Notre intérêt pour la Bêta-1-C globuline prend ici sa source.

La notion de "fraîcheur du sérum" est toute relative : le sérum est long à isoler du sang lors de l'exsudation préparative in vitro qui accompagne la rétraction du caillot. Le vieillissement,

./...

la labilité du complément débutent dès son contact avec le matériel de prélèvement, ce qui entraîne une limite obligatoire lorsqu'on doit l'identifier puis le doser sur ce matériel. L'utilisation exhaustive de macrométhodes que ces difficultés entraînent laisse inexploré le domaine des "petits animaux". Parmi eux : les jeunes animaux et plus encore les embryons.

Seule la mise au point d'une micro-technique qui, autant que faire se peut, minimiserait ces obstacles, pourrait élever le seuil de réponse des tests qualitatifs ou quantitatifs pratiqués sur sérums, et même, autoriserait l'étude du complément à partir de liquides biologiques dont seuls de très petits volumes sont disponibles.

Le rapport de sensibilité de ces méthodes (les macrométhodes et la microméthode) doit pour le moins vérifier le bien-fondé de notre étude.

Ainsi, la micro-méthode personnelle en question portera d'abord sur le mode de prélèvement. Puis les tests qualitatifs et quantitatifs porteront sur le matériel obtenu:

- les analyses immuno-électrophorétiques de ces prélèvements avec immun-sérum polyvalent (total) et avec immun-sérum monovalent (anti-Bêta-1-C)
- Les dosages du complément hémolytique global effectués sur ces mêmes prélèvements par une ultra-microméthode personnelle.

...

Enfin, à l'aide de ces deux tests, on recherchera, parallèlement aux essais précédents, la Bêta-1-C globuline comme l'activité complémentaire globale hémolytique, sur des prélèvements obtenus par les macrométhodes classiques.

Si ces tests immunologiques restent négatifs lorsque le compartiment humoral est exploré à l'âge péri-natal, ceci n'implique pas obligatoirement l'absence de complément ou de Bêta-1-C circulants: l'éventualité d'un seuil d'activité du complément inférieur à la limite de sensibilité de ces tests nous oblige alors à explorer le compartiment humoral indirectement à l'occasion de l'exploration cryo-histologique immédiate d'embryons dont le compartiment cellulaire doit céder les facteurs du complément qu'il synthétise au compartiment humoral. La Bêta-1-C servira de traceur du complément humoral et sera révélée par un immun-sérum monovalent anti-Bêta-1-C globuline, ce qui nous autorise en outre et conjointement à la recherche physiologique de la formation du complément humoral, la recherche cytophysiologique de la formation de sa fraction Bêta-1-C chez l'embryon.

La possibilité qui s'offre de contrôler avec précision l'âge des embryons chez l'oiseau a commandé le choix de ce vertébré ovipare. Le poulet dont on connait bien l'élevage sera l'animal d'expérience.

...

Il est prévisible qu'à côté de tissus dont seules les coupes de vaisseaux sanguins fluorescent de façon plus ou moins spécifique, les tissus les plus vascularisés permettront peut-être d'obtenir des images fluorescentes spécifiques dans la lumière vasculaire si le plasma qui y demeure recèle soit du complément, soit la Bêta-1-C seule.

Mais l'organe qui, le premier, va permettre en outre l'observation de fluorescences extra-vasculaires à l'échelle infra-cellulaire, cellulaire, ou mieux, va permettre l'observation de fluorescences intra cellulaires, sera le point de départ de la recherche de la première formation in situ de la Bêta-1-C globuline en remontant dans l'âge pour déterminer à quel stade du développement de l'organe on obtient l'extinction de la fluorescence cellulaire positive du dernier site.

Mais ceci n'implique pas qu'on ne puisse trouver sur les tissus non encore explorés, une extinction plus précoce. Il convient donc de rechercher systématiquement la première formation de la Bêta-1-C au moyen de coupes sériées d'embryons exploités in toto qui devraient nous apprendre que la Bêta-1-C n'est révélable dans les lumières vasculaires qu'à partir de tel ou tel stade du développement, et que la Bêta-1-C est révélable dans les cellules de telle catégorie cellulaire ou ébauche d'organe à partir de tel ou tel autre stade probablement antérieur.

...

Ayant obtenu par ailleurs en immuno-électrophorèse contre un anti-sérum monovalent anti-Bêta-1-C globuline un seul arc de précipitation à partir de broyats d'organes embryonnaires exsangues et très frais, alors que les essais correspondant aux mêmes broyats moins frais restent négatifs, nous chercherons en immuno-fluorescence directe sur coupes fraîches de ces organes à préciser la nature de l'antigène et à vérifier l'origine cellulaire de la Bêta-1-C de nos broyats.

Si les derniers stades de l'organogenèse de l'embryon autorisent le prélèvement précis d'organes déjà différenciés à l'exclusion de toute autre catégorie tissulaire en vue de préparer des broyats homogènes, il n'en va plus de même lorsqu'on dissèque sur les premiers stades de l'incubation où les ébauches difficiles à identifier et à séparer ne pourront être explorées sans perte et identifiées qu'au moyen de coupes serriées effectuées au cryostat autorisant le contrôle d'identité histologique si, parallèlement aux coupes à traiter par le sérum conjugué une coupe sur deux est traitée par un colorant topographique général compatible avec la fixation de coupes sur matériel embryonnaire frais congelé.

De plus, la préparation de sérums anti-organes monovalents aura pour objet de contrôler l'identité des organes positifs et la spécificité de la technique d'immuno fluorescence utilisée et permettra peut-être d'identifier les cellules qui fluorescent.

...

L'extinction de la fluorescence par l'hydrazine aura pour objet d'identifier le site antigène de la Bêta-1-C globuline à sa source.

Suivant, l'utilisation d'une technique de mesure de la densité de population cellulaire Bêta-1-C formatrice en immuno-fluorescence est envisagée et a pour objet de suivre l'évolution de la Bêta-1-C globuline depuis sa première formation dans la différenciation de l'organe ou des organes qui seraient ou deviendraient compétents, jusqu'à ce que le taux de complément sérique frais soit stabilisé.

Nous pouvons dès à présent attendre de cette dernière étude cytophysiologique qu'elle contribue à boucler le cycle de nos investigations là où le compartiment humoral échappe à la sensibilité de notre ultra-microméthode sérologique, et s'achève là où cette ultra-microméthode a permis de situer le palier supérieur de l'activité hémolytique du compartiment humoral chez le poulet.

PREMIERE PARTIE : MATERIEL ET TECHNIQUES

I- ISOLEMENT DU SERUM EN VUE DE PRESERVER SA FRAICHEUR

A- Macrométhode classique : ponction veineuse

B- Microtechnique personnelle.

A. MACROTECHNIQUE CLASSIQUE : ponction veineuse.

Intérêt.

Le choix de " la saignée " est dicté par des considérations d'ordre pratique : prélever quelques millilitres de sang total à un cheval revient à prélever au lapin quelques gouttes de sang.

Toutefois, si quelques millilitres de sang peuvent fournir après exsudation et centrifugation un volume de sérum pur manipulable, il n'en va pas de même de quelques gouttes de sang. A fortiori lorsque les analyses qualitatives et surtout quantitatives de sérum utilisées nécessitent une prise initiale de sérum pur mesurable. En outre, il n'est pas toujours souhaitable d'avoir recours à des mélanges de sang.

Principe.

Pour obtenir du sérum pur en quantité suffisante, on pratiquera des ponctions intraveineuses ou intracardiaques, ménagées si l'on désire garder l'animal en vie, ou plus importantes si l'on veut davantage de sérum.

Matériel

Selon qu'on s'adresse à de gros ou à de petits

...

animaux, on choisira l'aiguille et la seringue, le catether, qui s'adaptent le mieux à la taille des compartiments vasculaires et à leur accessibilité. Puis le matériel de contention pour exsudation et centrifugation sera adapté au volume des saignées.

Mode opératoire.

La ponction de la veine marginale externe de l'oreille de lapin nécessite la mise en place d'une aiguille et qu'on laisse couler le sang dans un tube; on peut en recueillir ainsi 2 à 3 millilitres. La ponction du sinus caverneux à l'aide de pipette effilée enfoncée de IO à I2 mm. permet de récolter I à 2 ml. de sang chez les petits rongeurs comme le cobaye, le rat et surtout la souris. Chez les oiseaux, la ponction dans la veine humérale qui croise l'articulation huméro-cubitale à la face interne de l'aile permet de recueillir facilement 2 à 3 ml de sang.

La ponction cardiaque des petits animaux permet de recueillir des quantités plus importantes de sang.

De toute façon, pour séparer le sérum il faut laisser exsuder le sang quelques heures, le plus souvent 24 heures à la température du laboratoire ou entre + 4° et + 8° C. en tubes stériles fermés par du coton cardé. Une centrifugation ménagée permettra une séparation du sérum dont un volume suffisant pourra être conservé à + 4° C à moins qu'on préfère le lyophiliser pour une conservation plus longue. C'est le cas pour le réactif

...

sérologique commercialisé sous le nom de complément de cobaye.

B. MICROTECHNIQUE PERSONNELLE

- Intérêt

L'isolement en "quantité suffisante" d'un volume initial de sérum passe par l'exsudation d'un volume plus important de sang, laquelle requiert un certain temps et implique donc nécessairement la dégradation inévitable de l'activité complémentaire, puisque celle-ci diminue avec la fraîcheur des sérums.

Pourquoi la Bêta-1-C globuline qui disparaît proportionnellement à la durée de conservation du sérum "frais" obtenu après exsudation et centrifugation, ne commencerait-elle pas à se dégrader en fonction du temps que prend nécessairement la rétraction du caillot et la centrifugation séparative ?

Si le matériel de prélèvement comme le matériel de contention sont " stériles " et " propres", les risques de contamination pendant la phase d'exsudation (qui ne se fait bien qu'à la température du laboratoire et qui de toute façon nécessite un certain temps) augmentent avec le temps et les surfaces de contact.

De plus, il est très difficile d'éviter la lyse d'un certain nombre d'hématies, laquelle, libérant de l'hémoglobine,colore plus ou moins le sérum.

Seule la mise au point d'une microtechnique qui, autant que faire se peut, minimiserait ces obstacles, pourrait élever le seuil de réponse des tests qualitatifs ou quantitatifs pratiqués sur sérum et autoriserait l'exploration du domaine des " petits animaux " parmi lesquels les jeunes animaux et plus encore les embryons.

Principe.

Réduire la prise de sang, c'est réduire le traumatisme que les grandes saignées impliquent et dont rien ne nous permet d'affirmer qu'il est sans influence sur les substances fragiles qu'on veut étudier. Il convient donc de perturber le moins possible les constantes biochimiques.

Recueillir le sang directement sur le tampon véronal de Mayer et Lévine, c'est assurer une exsudation dans les conditions requises pour déceler toute l'activité du complément, assurer également une rétraction du caillot plus libre et une isolation efficace du sang de l'air ambiant.

...

Pomper seulement un volume de sang qui ne dépasse pas le double de l'unique microgoutte qu'on recueille sous un volume constant dans un volume constant de tampon, et laisser se rétracter la goutte de sang au sein du tampon pendant exactement 90 minutes, c'est se donner le moyen d'isoler rapidement du sang une quantité constante de sérum frais. Quelles que soient les valeurs absolues de ces volumes, leur proportion relative reste la même.

Matériel.

Pipettes Pasteur munies de tétines compte-gouttes (stériles)

Un même lot de Tubes en polyéthylène de sections intérieure et extérieure standardisées "Catheter Biotrol - Usage chirurgical chimiquement neutre A jeter après emploi". Stérilisé sous gaine plastique, par 50 cm, conditionnement par 5." Tube N° 3 de 0,58 mm de diamètre intérieur et de 0,96 mm de diamètre extérieur. Suivant les lots la tolérance indiquée par le fabricant est de ± 10 %. Les diamètres pour un même lot sont rigoureusement identiques.

Tubes à hémolyse avec Tampon Mayer-Lévine pH 7,3 de l'Institut Pasteur.

Préparation du matériel.

Les vaccinostyles sont conditionnés stérilement et l'enveloppe en polyéthylène est rompue à l'aide du vaccinostyle lui-même, au dernier moment.

La lampe à ultraviolet est utilisée pour assurer pendant la préparation du matériel une stérilisation supplémentaire, elle est éteinte dès que l'animal est présent.

Des pipettes Pasteur sont effilées au bec bunzen et leur extrémité introduite dans une portion de tube en polyéthylène. A la flamme témoin du bec Bunzen on présente l'extrémité du tube en polyéthylène qui, en fondant, adhère au verre de l'extrémité effilée de la pipette Pasteur introduite sur quelques millimètres. L'extrémité libre du tube souple est sectionnée normalement à l'axe sans écrasement au moyen d'une lame. Dix centimètres de Catheter prolongent ainsi chaque pipette.

Une tétine compte-gouttes en latex est fixée à chaque pipette. Une boucle maintient le tube souple et donne de la rigidité à l'ensemble qui ainsi, se trouve raccourci. Une quantité importante de ces instruments est préparée. Les diamètres intérieur et extérieur du tube sont constants (0,58/ 0,96 mm) pour un même lot (5 fois 50 cm de tube stérile).

...

La solution tamponnée concentrée de MAYER provient de l'Institut Pasteur. A un volume de cette solution mère, quatre volumes d'eau distillée sont ajoutés. La solution isotonique ainsi obtenue de pH 7,3, contient les ions Mg^{++} et Ca^{++} à leur optimum de concentration. Elle peut être conservée pendant 24 heures.

Dans un tube à hémolyse on introduit exactement 14 gouttes de tampon dilué au 1/5 à l'aide d'un des compte-gouttes préparés qu'on jette ensuite. Le tube est placé au bain-marie à 37° C.

- Mode opératoire

L'animal est fixé sur le dos par trois membres. On lave la patte libre à l'eau savonneuse, on rince soigneusement et on sèche à l'alcool (On a rasé les poils autour de la veine digitale à la base du premier doigt).

Le vaccinostyle étant muni d'une garde, on pratique une incision standardisée au niveau du pli de l'articulation où la peau plus fine permet d'atteindre la veine digitale d'où le sang sourde immédiatement. Sans presser, on aspire dès que la goutte, formée sans étalement, permet l'introduction de l'extrémité d'un cathéter monté. Le débit maintient le volume de la goutte de sang à peu près constant pendant sa ponction.

Un volume de sang total qui n'excède pas le double du volume de la goutte à recueillir, n'atteint pas le verre de la pipette Pasteur (figure N° 1 - page 52).

On interrompt la ponction et on laisse la goutte qu'on forme immédiatement au-dessus du tube à hémolyse, tomber d'elle-même dans l'axe du tube. Cette micro-goutte "coule" au fond du tube au sein du tampon à 37° C (figure N° 2 - page 53).

Cette opération, liée au prélèvement proprement dit sur l'animal proche s'effectue à la température du laboratoire. Mais l'exsudation s'effectue dans le tampon Mayer-Lévine à 37° C. On déclenche un chronomètre au moment où la microgoutte tombe dans le tampon. 90 minutes après, la goutte rétractée, retenue au fond par un fin pédicule hyalin, flotte au sein du tampon : on transporte alors le tube du bain-marie à la centrifugeuse où une centrifugation en plots réfrigérés (-20° C) débute 30 secondes plus tard. En effet, la pesée pour équilibration n'est pas nécessaire : un tube identique contenant les 14 gouttes de tampon et une goutte de sang attend dans la centrifugeuse. La centrifugation à 9.000 tours/mn dure exactement trois minutes. Le surnageant est recueilli par aspiration, à l'aide du système micro compte-gouttes (tétine-pipette Pasteur-cathéter) dans un tube à hémolyse à + 4 ° C et est utilisé dans l'heure qui suit ...

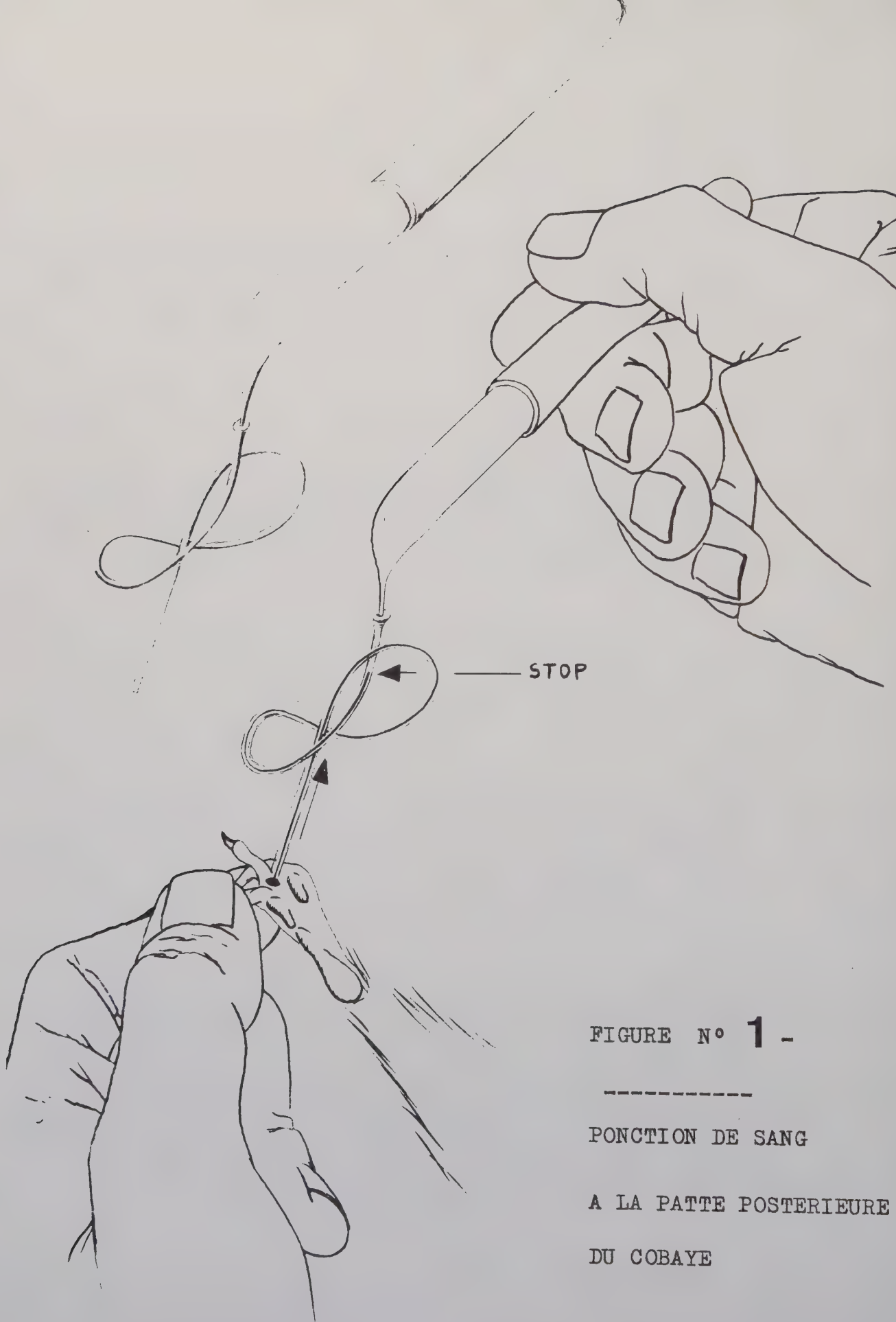


FIGURE Nº 1 -

PONCTION DE SANG

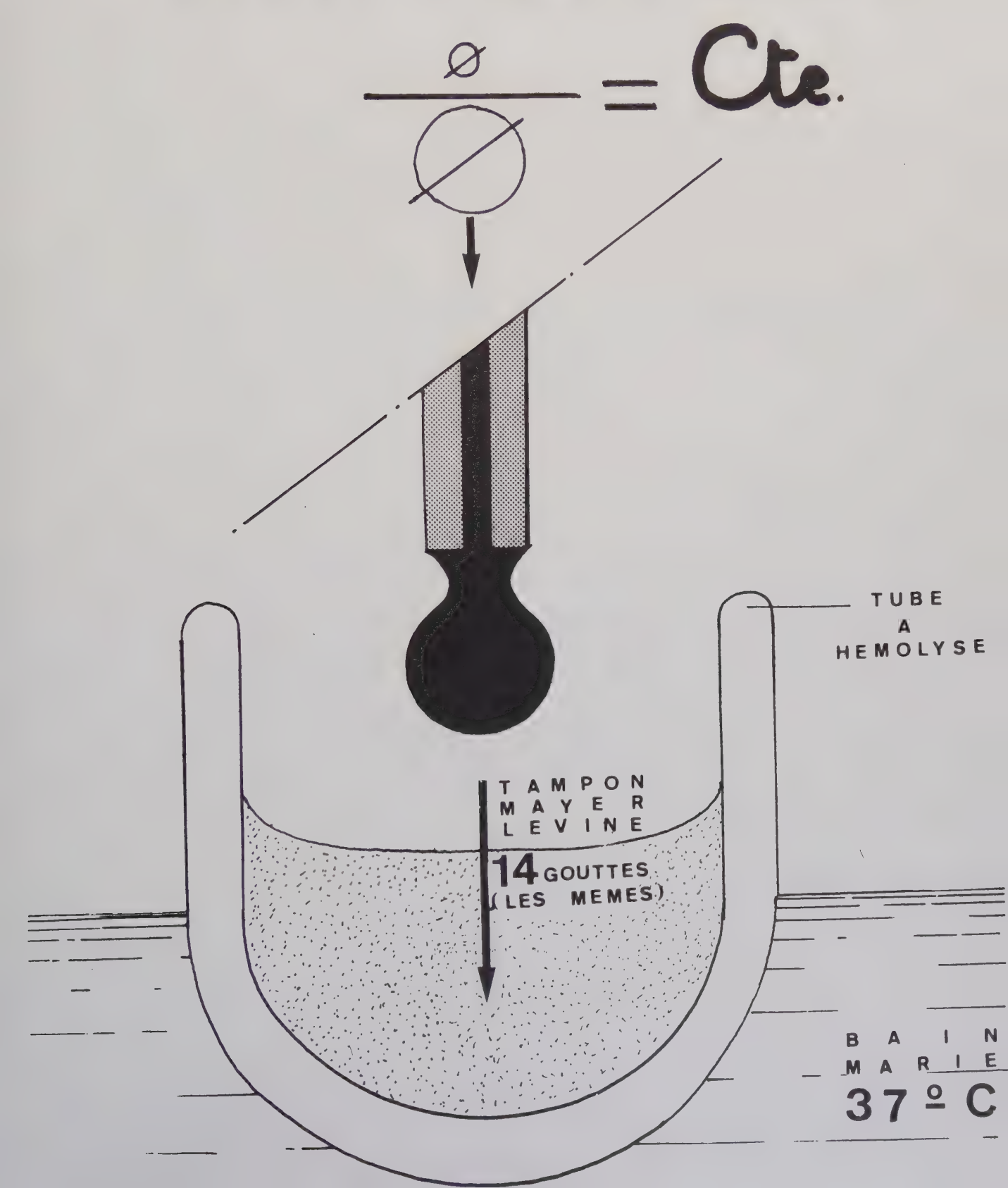
A LA PATTE POSTERIEURE

DU COBAYE

FIG. N°2

DISTRIBUTION D UNE GOUTTE
REPRODUCTION DU VOLUME
SANGUIN IDENTIQUE

$$\frac{\varnothing}{\varnothing} = Cte.$$



II - PREPARATIONS D'ORGANES CHEZ L'EMBRYON ET AU DELA DE L'ECLOSION

A - Matériel

B - Mode opératoire

A. MATERIEL

La possibilité qui s'offre de contrôler avec précision, chez l'oiseau, l'âge des embryons, puis des individus, se développant et développés, a commandé le choix de ce vertébré ovipare. Le poulet, dont on connaît bien l'élevage, sera l'animal d'expérience : on peut se procurer des oeufs fécondés dits "embryonnés" assurant un pourcentage d'éclosion avoisinant 85 % ; on peut alors envisager l'étude sur une lignée génétiquement homogène et définie d'individus dont on peut, avec certitude, connaître l'âge et les particularités.

1 - Les oeufs

Ils sont fournis par le Centre National de recherches zootechniques (Domaine de Villevert à Jouy-en-Josas - 78).

Oeufs de poule Hubbard, lignée SYKES H_3

2 - La couveuse

"SELECTIOR" de type 200

3 - Les embryons poussins et poulets

Ils sont tous obtenus à la couveuse

4 - Le matériel de prélèvement

- centrifugeuse HETTICH ROTOMAGNA (APELAB J.C. MONTAGNE)
- loupe binoculaire Zeiss
- boîtes de pétri ; instruments (pinces, ciseaux en acier inoxydables) sont stériles, papier stérile Whatmann pour chromatographie "3 MM".

- l'eau physiologique est stérile et utilisée à la température d'incubation
- tubes à hémolyse stériles.

B. MODE OPERATOIRE

1 - Incubation des oeufs

On place les oeufs en couveuse de façon à traiter en même temps plusieurs stades du développement embryonnaire. La couveuse assure une température d'incubation constante de 38°,5 C et une atmosphère humide constante par renouvellement d'eau, et maintient un degré hygrométrique approprié.

2 - Prélèvement des embryons sur stades jeunes

Ces embryons sont prélevés une fois la coquille lavée (eau physiologique) et le contenu versé dans une boîte de Pétri contenant de l'eau physiologique à 38°-39° C environ : la masse en eau et de l'oeuf et de l'eau physiologique assurant la tenue de cette température pendant les trois minutes nécessaires au prélèvement de l'embryon par rupture des membranes amniotiques et section du pédicule vitellin (attaches omphalomésentériques). La lampe à incandescence qui éclaire le champ (en vision binoculaire) contribue au maintien de cette température physiologique.

Une quantité suffisante d'eau physiologique placée en couveuse permet de renouveler le bain lors du lavage pour éclaircir le champ ou rincer l'embryon prélevé. Plusieurs boîtes de Pétri sont ainsi utilisées pour prélever un seul embryon (quatre boîtes, le plus souvent).

Aussitôt prélevés les embryons sont placés sur les plots du microtome cryostatique en ayant soin de les orienter lors de leur congélation.

./...

Ils attendront ainsi à - 30°C, 15 minutes avant d'être débités in toto. On traite ainsi par lots de quatre embryons de même âge les plus jeunes stades de l'incubation pour investigations en immunofluorescence (voir cette technique : 6ème partie (VI) de ce châpitre).

Les résultats de cette étude commanderont par la suite le prélèvement exhaustif d'organes embryonnaires sur des stades d'incubation plus avancée, puis sur des sujets après éclosion. Ces nouveaux prélèvements seront traités de la même façon : selon l'âge, ils seront plus ou moins volumineux et pourront nécessiter le morcellement préalable requis pour l'étude de coupes fines.

D'autre part, il viendra un moment où les résultats de notre étude commanderont des prélèvements d'organes en vue d'effectuer des broyats pour immunisation et obtention d'immun-sérums anti-cellulaires :

3 - Prélèvements d'organes chez l'adulte
(à broyer, ou à congeler pour coupes).

Ces organes seront prélevés chez des poulets et poulettes de 3 mois, sacrifiés par hémorragie au moyen de section des troncs vasculo-nerveux au niveau des premières vertèbres cervicales. Les animaux préalablement déplumés dans un bain tiède isotherme seront rapidement disséqués en incisant la paroi abdominale (pour y prélever des viscères), et en incisant la peau du cou et les muscles peauciers pour prélever les chapelets thymiques latéraux-ventraux.

a) Prélèvement du thymus de poulets de 90 jours.

Chaque chapelet est constitué de menus lobules aplatis plus ou moins séparés (9 ou 10), et est parallèle à l'axe sagittal médian de l'animal. Chez des poulets de 3 mois, on prélèvera ainsi une vingtaine de lobules par animal (les plus gros étant les lobules cervicaux, leur taille s'amenuisant au fur et à mesure qu'on se rapproche des masses musculaires pectorales qui masquent les derniers). Le poids total de ces lobules est de 4,5 gr. lorsque après avoir récliné l'ensemble du paquet vasculo-nerveux du cou sur lequel ils sont branchés en dérivation, on élimine les aponévroses de chaque lobe fusiforme, lenticulaire ou nummulaire (ARVY. L. 1963) et le paquet vasculo-nerveux.

Pour ce faire, on allonge les chapelets thymiques sur un papier type chromatographie (Whatmann 3 MM) découpé en feuilles de 10 X 10 et dont le pourtour est fixé à l'aide de bandes adhésives à la paillasse de verre.

Sous la loupe binoculaire, chaque lobule sera débarrassé facilement de son enveloppe (aponévrose) qui adhère au papier. Deux paires de pinces fines suffisent. Chaque lobule sera lavé en eau physiologique pour le débarrasser rapidement du papier qui y reste collé et ira dans un tube à hémolyse stérile contenant 1 ml d'eau physiologique à 0° C (tubes à hémolyse en bain de glace).

Chaque tube à hémolyse contiendra en fin d'opération 1 ml d'eau physiologique et un demi-thymus (soit un chapelet de 9 ou 10 lobules).

4 poulets de 90 jours (deux mâles et deux femelles) fournissent 4 thymus soit 8 chapelets donc 8 tubes à hémolyse. Le portoir ira alors à la chambre froide à - 25°C.

La pesée des tubes à hémolyse est réalisée au préalable de façon à choisir des tubes de poids voisin et chaque tube porte la mention de son propre poids (en général 6,8 gr.) et celle du poids d'eau physiologique (1 gr environ).

Les tubes seront pesés de nouveau après congélation (c'est-à-dire congelés) pour connaître pour chacun le rapport du poids d'eau au poids d'organe. 8 tubes fournissent généralement 26 gr. dont I8 gr. de thymus à broyer avec 8 gr. d'eau physiologique après décongélation.

- broyats de thymus (élimination du sang).

Dans un mortier préalablement placé à - 25° C, on place 3 cm^3 de sable de grès de Fontainebleau lavé et stérile. Il s'agit d'obtenir une pulpe et non des fractions subcellulaires: l'écrasement sera donc modéré (manuel)

Une centrifugation de 3 minutes à 9000 t/mn de la pulpe additionnée d'eau physiologique (I8 gr de pulpe + 8 gr. d'eau physiologique + 3 cc sable + 20 ml d'eau physiologique de lavage) permet de séparer un surnageant limpide mais coloré, chargé d'oxyhémoglobine
Ce surnageant est jeté. Le culot de centrifugation (sable et pulpe) est repris par 20 ml d'eau physiologique, brassé à l'aide d'un agitateur stérile et recentrifugé 3 minutes à 9000 t/mn. Le surnageant est jeté. Un dernier lavage identique permet d'obtenir un surnageant incolore: l'évaluation de l'oxyhémoglobine libérée est lue au spectrophotomètre Spila-Lerès à 54I mμ (des lavages supplémentaires ne modifiant plus la transmission on s'en tient à ce protocole).

- broyat de la pulpe de thymus (éclatement des cellules).

Le culot de centrifugation (pulpe et sable) est repris au mortier (-25° C) par addition d'un même volume d'eau physiologique et est réduit en "purée laiteuse ". Une dernère centrifugation de 3 minutes à I500 t/mn suffit à séparer le sable et permet de récupérer un surnageant sans trop de perte. Cette suspension est placée à -25° C. Nous verrons dans la cinquième partie de ce chapitre (V: préparation d'immuns-sérums anti-organe) l'utilisation qui en sera faite après contrôle de la concentration en protéine de cette suspension qui sera utilisée pour l'immunisation.

b) Prélèvement de bourse de Fabricius de poulets de 90 jours.

L'incision médiane de la paroi abdominale ne suffit pas. Deux volets sont découpés et rabattus juste au dessus de l'orifice du cloaque. On ne coupe pas l'intestin terminal qui masque la bourse, laquelle est située médio-dorsalement par rapport au rectum et juste contre lui, entre les uretères chez la femelle et entre les uretères et les déférents chez le mâle. Le col de la bourse s'ouvrant au niveau du proctodéum qui fait suite à l'urodéum dans le cloaque, il suffit de couper les attaches mésentériques qui relient ventralement la bourse à l'intestion dorsal dans le plan sagittal médian, puis les aponévroses qui la relient

...

au tronc vertébral entre le synsacrum et le pygostyle, et de terminer par la section du col sans presser les intestins.

Dans une boite de Pétri, remplie d'eau physiologique à 39° C, on lavera intérieurement et extérieurement l'organe : cette "poire" de la grosseur d'une petite noix chassera en la pressant modérément le contenu de son col si lors du prélèvement un peu du contenu du proctodéum y a pénétré. Puis dans une autre boite de Pétri remplie d'eau physiologique on fera l'incision médiane à partir du col pour évaginer le tissu lympho épithélial qui remplissait la bourse, sa cavité étant réduite au minimum à cet âge.

A 1'aide de deux paires de pinces fines, on désolidarisera la thèque musculeuse du tissu lympho épithélial pour ne garder que ce dernier. (Cette thèque pèse 1 gr 25 environ).

A 1'aide du papier (Whatmann 3 MM pour chromatographie) on sèchera ce prélèvement (rapidement). Avec une pince fine et des ciseaux, on coupera le tissu en petits morceaux qui rejoindront 1 ml d'eau physiologique dans un tube à hémolyse. 12 tubes identiques attendent en bain de glace. Chacun contient 2,25 gr environ de tissu lympho-épithélial fabricien frais ... Le portoir ira aussitôt le prélèvement terminé (12 animaux dont 6 poulets et 6 poulettes) à -25°C .

La pesée à la congélation donnera environ 27 grammes au total pour le tissu frais et 12 grammes pour l'eau physiologique.

- broyat du tissu lympho-épithélial fabricien (élimination du cortex).

La vascularisation et l'innervation péri et inter-folliculaires donnent à chacun des follicules fabriciens un rameau qui s'arborise en un réseau situé à la limite du cortex et de la médullaire ; les médullaires des follicules fabriciens sont avasculaires et privées de nerfs, car le réseau vasculaire, et les fibrilles nerveuses inféodées à ces vaisseaux, situé à la limite interne du cortex, ne donne de branches, d'ailleurs fort brèves, qu'à ce dernier, comme l'avait parfaitement montré JOLLY (JOLLY.J. 1915), à l'aide d'injections vasculaires de gélatine au bleu de Prusse.

(Rien d'étonnant à ce que lors de la décongélation, l'eau physiologique (contrairement au thymus) soit peu colorée par l'hémoglobine).

Dans un mortier préalablement placé à - 25° C, on place le contenu solidifié des 12 tubes (soit 27 grammes de tissu frais et 12 grammes d'eau physiologique) et 4,5 gr. de sable de grès de Fontainebleau lavé et stérile. Un écrasement modéré avec 30 ml d'eau physiologique et une centrifugation légère (3 minutes à 1.500 t/mn) suffisent à séparer

du sable un surnageant peu coloré et limpide qu'on jette. Le culot de centrifugation présente trois zones: les deux dernières peu séparées montrent le sable au fond et, au dessus, du sable plus foncé; mais la zone suppérieure (d'un blanc laiteux) se détache sans difficulté et se remet en suspension dans trois fois son volume d'eau physiologique soit: 15 ml. Cette zone correspond aux éléments de la médullaire Fabricienne.

Un agitateur stérile permet de remettre en suspension ces 5ml de prélèvement. Une centrifugation à 9.000 t/mn pendant 3 minutes séparera un surnageant limpide (3 ml sont testés au spectrophomètre à 541 mμ: la transmission est la même que celle obtenue pour le surnageant de la pulpe de thymus, c'est-à-dire égale à celle de l'eau physiologique témoin). On gardera ces 5 ml de prélèvement à 0°C (en bain de glace) dans les 12 ml d'eau physiologique restant puis on passera au broyage final.

- <u>broyage de médullaires (follicules fabriciens debarassés de leur cortex</u>.

Dans un mortier préalablement placé à -25° C on fera passer ces 12 ml d'eau physiologique (surnageant) et le tissu médullaire (culot); on ajoutera 1 ml de sable de Fontainebleau lavé et stérile et on écrasera énergiquement jusqu'à obtention d'une purée fine (10minutes).

.../...

Une dernière centrifugation de 3 minutes à I500 t/mn permettra de séparer le sable du surnageant (IO ml environ) auquel on ajoutera la galette blanche supérieure. La suspension est placée en tube bouché (caoutchouc) à -25° C. Nous verrons dans la cinquième partie de ce chapître (V: préparation d'immun-sérums anti-organe) l'utilisation qui en sera faite après contrôle de la concentration en protéines de cette suspension.

III - TECHNIQUE D'IMMUNO-ELECTROPHORESE

III - TECHNIQUE D'IMMUNO-ELECTROPHORESE :

A - Intérêt :

Ne serait-ce que pour tester notre outil le plus précis : l'immun-sérum monovalent anti-Bêta-1-C globuline, pour vérifier sa spécifité et sa monovalence, la recherche immuno-électrophorétique d'un seul arc de précipitation vis-à-vis du sérum total frais contenant la Bêta-1-C et la recherche de sa place par rapport à l'arc de précipitation immuno-électrophorétique correspondant à un anti-sérum total s'imposent.

Pour identifier la Bêta-1-C dans nos prélèvements chez le cobaye ou chez le poulet, cette méthode qualitative mais peu quantitative complète et accompagne les dosages de complément hémolytique sur le compartiment sérique comme sur le compartiment cellulaire.

En effet, les procédés adoptés pour l'obtention d'immun-sérums précipitants étant empiriques, on est tenu de tester chaque immun-sérum pour connaître ses propriétés avant de l'utiliser.

Pour déceler sa présence dans un broyat tissulaire d'une fraction (même très antigénique), à faible concentration, il faut utiliser un sérum d'un animal qui a été immunisé avec un broyat riche en cette fraction (NGUYEN-TRONG-THU, 1963).

B - Principe :

Les anticorps de l'immun-sérum précipitant et les fractions protéiniques de l'antigène, préalablement séparées par électrophorèse, diffusent dans le gel et lorsqu'ils se rencontrent en proportions convenables, ils forment les complexes précipitants disposés en arcs para-paraboliques. La parabole est, en effet, le lieu géométrique des points équidistants d'un point fixe F appelé foyer et d'une droite appelée directrice.

En l'occurence, D est la fente d'immun-sérums, F est la position de la fraction protéique définie par sa mobilité électrophorétique (NGUYEN-TRONG-THU 1963,)

L'excès des protéines antigènes ou anticorps est lavé par immersion de la plaque de gélose dans de l'eau salée à 9 o/oo. On dessèche la gélose en la recouvrant d'un papier filtre épais imbibé d'eau, le tout dans une ambiance chaude vers 50°C. On enlève le papier filtre par désagrégation sous un courant d'eau et colore le film de gélose desséchée, par divers colorants appropriés dissous dans de l'éthanol et acide acétique. On décolore le fond par le même solvant. On procède ensuite aux observations la lecture étant d'autant plus claire que la dispersion électrophorétique est optimale, que le degré de la précipitation (et donc de la coloration) est grand. Ceci dépend de la concentration des substances antigéniques dans le mélange à analyser (sérum pur ou dilué liquides biologiques divers, tissus frais, lyophulisats repris par du soluté physiologique), du degré antigénique des substances, de la présence dans l'immun-sérum utilisé d'anticorps précipitant ces substances antigéniques.

C - MATERIEL

1 - Les anticorps

Deux sortes d'immun-sérums seront utilisées : immun-sérum monovalent et immun-sérums polyvalents.

a) Appartenant à la première catégorie, un "immun-sérum spécifique monovalent pour études immuno-chimiques" fourni par l'Institut Pasteur en ampoule de 1 ml, sous le nom d'"immun-sérum de chèvre anti-Bêta-1-C globuline humaine à conserver à + 4°C" sera testé.

b) Appartenant à la deuxième catégorie : des immun-sérums de lapin anti-sérum total de cobaye obtenus, soit à partir de sérum de cobaye frais, soit à partir de sérum de cobaye vieilli, sont des immun-sérums anti-sérum Total.

Ces immun-sérums là, nous les préparons nous-mêmes. Nous verrons dans la cinquième partie de ce chapitre (V - Préparation d'immun-sérums anti-organes et d'immun-sérums anti-sérums totaux) comment nous les obtenons.

Enfin, à la seconde catégorie (immun-sérums polyvalents) appartiennent des immun-sérums incomplets. Ils sont fournis par l'Institut Pasteur sous le nom d'"immun-sérums anti-globulines" et correspondent aux seules globulines IG de différentes espèces animales. Ils sont obtenus chez le lapin et sont :

(1) - anti-sérum de lapin anti-immuno-globulines de cobaye,
(2) - -d°- -d°- de poule.

Les anti-sérums de chèvre, comme les anti-sérums de lapin contiennent des anticorps de type "précipitants".

Contrairement aux anticorps de cheval (du type floculant) donnant des précipités dans une zône relativement restreinte de rapports antigène-anticorps et formant des complexes solubles en présence d'un excès d'anticorps, les anticorps de chèvre, comme les anticorps de lapin, ne forment des complexes solubles qu'en présence d'un excès d'antigène (NGUYEN-TRONG-THU, 1963).

2 - Les antigènes

Plusieurs substances biologiques seront analysées par séparation électrophorétique (premier temps de l'immuno-électrophorèse). Ce sont :

(1) - sérum de cobaye frais (adulte de 500 gr. mâle)
(2) - sérum de cobaye vieilli : 3 semaines à + 4°C (même animal)
(3) - les prélèvements issus de notre microméthode chez le cobaye adulte de 500 gr. mâle.

(4) - des liquides biologiques obtenus chez le poulet :
- liquide amniotique de 12 et 16 jours d'incubation
- Vitellius de 12 et 16 jours d'incubation
- sérum de poussin à l'éclosion (1 jour)
- sérum de poulets de 3 mois (90 jours)

(5) - Tissus, broyats, surnageants de différents organes chez le poulet nouveau-né (22 jours d'incubation = poussin de 1 jour)
- Intestin d'embryon de poulet (poussin de 1 jour) (Tissue-electrophoresis)
- Poumon
- Foie
- Rate
- Pancréas
- Cerveau
- Muscle

3 - Hydrazine

Hydrazine dichlorhydrate pour usage scientifique (fournisseur : L.B.B., 33, rue Voltaire - Puteau) "Hydrazinium chloride" NH_2 NH_2, 2 HCl ; P.M. : 104,97

4 - Gélose

Agar Pur S T D DAVIS fournie par APELAB

5 - Lames

76 x 26 mm. verre pour microscopie

6 - Appareils à électrophorèse

- Redresseur de J.C. MONTAGNE Type ST 3B fourni par APELAB
- Bac pour électrophorèse APELAB

7 - Tampon pH = 8,4

Il est obtenu en dissolvant 17 gr. de barbital sodique par litre d'eau distillée. Le pH est obtenu par addition de la quantité nécessaire et suffisante d'acide chlorhydrique 0,1 N. Compléter à 1 litre, après cette addition.

Ce tampon sera dilué de moitié au moyen d'eau distillée au moment de l'emploi. Il sert au remplissage des cuves et à la préparation de la solution de gélose à 1 %.

8 - Gélose à 1 %

Dans la solution tampon diluée au 1/2, dissoudre à chaud 1 gr de gélose dans 100 ml de solution tampon en maintenant une douce ébullition pendant 10 minutes. Laisser ensuite ce mélange dans un bain-marie à 100° durant 10 minutes. Filtrer sur Buchner et verre fritté. Remettre au bain-marie afin de conserver la fluidité durant la confection des lames. Couler 3,5 ml de cette solution sur des lames de verre préalablement lavées au mélange sulfochromique (lames 76 x 26 mm.). Laisser au froid (+ 4 à 5°) durant une nuit. Poser l'emporte-pièce sur la lame pour prendre l'emplacement des réservoirs longitudinaux et le cercle intérieur. Evider seulement le cercle. Déposer l'antigène (0,035 à 0,40 ml par trou).

D - MODE OPERATOIRE

1 - Pratiquer l'électrophorèse. Les lames seront posées sur des éponges plongeant dans le tampon. Le contact entre l'éponge et la gélose est établi en interposant un pont de gélose (obtenu en découpant en 8 parties égales la gélose coulée sur une lame).

Une différence de potentiel de 60 volts est réglée sur le redresseur. Ce voltage ne doit pas varier durant toute l'électrophorèse. La mesure du voltage prise aux limites du pont et de la gélose de chaque côté de la lame donne un voltage de 40 volts. Durée de l'électrophorèse : 80 minutes.

2 - Immunoélectrophorèse proprement dite

Les réservoirs longitudinaux sont évidés, puis remplis avec de l'anti-sérum pur ou dilué (eau physiologique) selon le cas. Ce remplissage nécessite un volume de 0,30 à 0,35 ml de solution de sérum pur par réservoir, donc 0,60 ml à 0,70 ml par lame.

Les lames sont placées dans une enceinte humide durant 48 heures. Ensuite, la partie de gélose touchant le bord de la lame est otée de chaque côté. Le lavage est obtenu par trempage des lames dans du sérum physiologique, renouvelé le lendemain, puis tous les jours durant une semaine.

Les lames sont sorties et recouvertes d'un papier type chromatographie (WHATMANN 3 MM) de dimensions 26 X 76mm. Sécher à l'air libre sous infra-rouges. Enlever le papier en l'humidifiant (eau distillée) parce qu'il peut adhérer au film sec de gélose. On évite ainsi de laisser des brins de papier. Passer sous jet d'eau distillée (pissette) et sécher rapidement sous infra_rouges.

3 - Coloration

La coloration est pratiquée durant 20 minutes dans l'Azocarmin 0,5 %. Solvant :

- Alcool méthylique	900 ml
- Acide acétique pur	100 ml
	1 litre de solvant
- Azocarmin à 0,5 %	0,5 gr
- Solvant	100 ml

4 - Décoloration

Elle se fait dans le solvant ci-dessus et dure 24 heures. Séchage et étiquettage suivent.

5 - Photographies

Directement sur papier épreuve, la lame servant de diapositive. On obtient des épreuves papier négatives (les arcs de précipitation apparaissent en blanc sur fond noir)

On projette les lames elles-mêmes à l'agrandisseur sur un papier contraste AGFA D.3 en chambre noire.

La mise au point se fait sur un papier de fond blanc. Le tirage de l'agrandisseur est réglé de façon à obtenir une image 3 X. On dessine au crayon le périmètre de la lame projetée sur le plan de projection (60 cm. de la lampe de projection de 250 watts. Ce repérage servira à placer correctement le papier sensible lorsqu'on aura occulté le local (chambre noire + lampe rouge classique). Une demi-seconde suffit dans ces conditions. Le papier est révèlé à vue et la fixation et le lavage classiques suivent. On glace les épreuves - séchage et finition au massicot. un crayon permet de repérer par un numéro au dos de la feuille chaque immuno-électrophorèse et le haut et le bas (orientation - +).

6 - Notes techniques

- Entre 2 lames de rasoir de l'emporte-pièce
  l'espacement intérieur est ..... 3 mm.
  l'espacement extérieur est ..... 4 mm

- Entre les 2 groupes de lames parallèles dans le bac à électrophorèse
  l'espacement intérieur est de ..... 13,5 mm

- Diamètre du trou de "dépôt antigène".. 5 mm

- Volume de l'antigène nécessaire au remplissage de ce trou ..... 0,035 à 0,040 ml
- Volume de l'anti-sérum ou de sa dilution à introduire dans chaque fente 0,32 à 0,35 ml

IV - MESURE DE L'ACTIVITE HEMOLYTIQUE DU COMPLEMENT GLOBAL

A - Dosage du complément par la technique classique à 50 % d'hémolyse (ROULIER).

1 - Intérêt
2 - Principe
3 - Matériel
4 - Préparation des réactifs
5 - Mode opératoire

B - Dosage du complément par mesure du temps d'hémolyse 50 % (dosage cinétique : Microtechnique de VARGUES).

1 - Intérêt
2 - Principe
3 - Mode opératoire
4 - Calculs

C - Ultra-microméthode personnelle
(Mesure de l'activité hémolytique du complément global des prélèvements classiques. Mesure de l'activité hémolytique des prélèvements obtenus par notre microméthode de prélèvement).

1 - Intérêt
2 - Préparation de la suspension d'hématies dans des conditions bien déterminées.
3 - Sensibilisation optimale de cette suspensi "0,3 D.O" dans des conditions bien déterminées.
4 - Concentration des hématies au sein de la réaction. Pourquoi "10.000 globules au microlitre" ?
5 - Titrage du complément avec un seul tube pa détermination du temps d'hémolyse 50 % Opacimétrie des globules rouges non lysés.

A - DOSAGE DU COM8LEMENT PAR LES TECHNIQUES CLASSIQUES à 50 % D'HEMOLYSE (SOULIER J.P. 1956) - (ROULIER, P. 1952).

1 - Intérêt

Le dosage du complément "global" (à l'encontre des dosages de ses fractions principales par les réactifs R_1 - R_2 - R_3 - R_4) ne nécessite pas de manipulations préparatives du sérum et utilise le sérum frais tel quel. Toutes les fractions connues du complément sont définies par rapport à leur activité sur le complexe "antigène-anticorps + les 8 autres fractions" en vue d'obtenir l'activité globale du système "antigène-anticorps-complément". L'action cytolytique requiert toutes les fractions connues (9 en tout) et la plus étudiée est l'activité hémolytique.

2 - Principe

A quantité constante d'un mélange : hématies de mouton (E) + sérum de lapin anti-hématies de mouton (A) = ambocepteur, sensibilisatrice) ⟶ E.A., sont ajoutées des doses croissantes du sérum à doser. Les hémolyses obtenues sont mesurées au photocolorimètre, après un temps d'incubation constant à température constante. La courbe établie d'après ces différentes valeurs (densités optiques des hémolyses par rapport aux doses de sérum), permet la détermination de la quantité de sérum qui provoque l'hémolyse de 50 % des hématies utilisées et représente ainsi une unité de complément $C'H_{50}$. Le nombre d'unités contenues dans 1 ml de sérum exprime son activité complémentaire.

3 - Matériel

- Bain d'eau entre 0° et 4°C
- Bain-marie à 37°C
- Centrifugeuse à froid
- Photocolorimètre
- Tampon utilisé pour les différentes suspensions et dilutions : Tampon véronal pH 7,4 de Mayet et Lévine (KABAT.E.A.1961) contenant des ions Ca^{++} et Mg^{++} et utilisé au 1/5 de la solution-mère suivante :

. Acide diéthylbarbiturique	5,75 g
. Diéthylbarbiturate de sodium	3,75 g
. Chlorure de calcium anhydre 0,3 M	5 ml
. Chlorure de magnésium $6H_2O$, 1 M	5 ml
. Chlorure de sodium	85 g
. Eau distillée q.s.p.	2.000 ml

- Les hématies de mouton : proviennent de l'Institut Pasteur (réactif sérologique)
- Le sérum hémolytique de lapin anti-hématies de mouton (même provenance)

4 - Préparation des réactifs

Les hématies de mouton sont lavées quatre fois au tampon véronal, puis mises en suspension à 1 % dans ce même tampon. La concentration globulaire est ajustée par la mesure de l'hémolyse totale au photocolorimètre (Ecran vert : 524 n.m.) comme suit : 1 ml de cette suspension, hémolysé par 3 ml d'eau distillée, doit avoir une densité optique égale à 0,50. Cette suspension est symbolisée par E.

Le sérum hémolytique de lapin anti-hématies de mouton est décomplémenté par chauffage au bain-marie 10 minutes à 37°C .

Le mélange à parties égales de la suspension d'hématies (ajustée : E) à 1 % et du sérum hémolytique dilué à 0,5 %, est incubé 15 minutes au bain-marie à 37°C. Il doit être utilisé extemporanément. Il est symbolisé par E.A.

5 - Mode opératoire

a) Vérification des densités optiques obtenues par l'hémolyse totale et par l'hémolyse de 50% des hématies de E.A.

La densité optique de l'hémolyse 100 % (totale) est obtenue en faisant : 1 ml S.A. + 3 ml eau distillée. La densité optique obtenue doit être égale à 0,25, soit la moitié de la densité optique obtenue avec l'hémolyse totale de la suspension E ajustée avant sa dilution par un volume égal de sérum hémolytique dilué.

La densité optique de l'hémolyse 50 % est obtenue en faisant 0,5 ml S.A.+3,5 ml eau distillée. La densité optique obtenue est égale à 0,125

b) Absorption systématique de l'hémolysine naturelle anti-mouton que le sérum à doser pourrait contenir.

A 1 ml de sérum on ajoute 0,3 ml d'hématies de mouton (culot) lavées. Un contact de 15 minutes à + 4°C et une centrifugation à froid (rapide : 2 minutes à 1500 t/mn. pour ne pas hémolyser les érythrocydes), permet de récupérer le sérum absorbé: Sérum ab. Le sérum à doser qui a été séparé après coagulation (d'au moins 2 heures à la température du laboratoire) du sang total prélevé par ponction veineuse, doit être utilisé "frais du jour" selon l'expression consacrée due aux sérologistes.

c) La réaction d'hémolyse

Pour chaque sérum, on prépare une série de 10 tubes contenant respectivement : 0,05 ml ; 0,10 ml ; 0,15 ml. 0,50 ml de ce sérum absorbé (sérum ab.) dilué au 1/10.

A chaque tube est ajouté 1 ml du mélange E.A. Après incubation, pendant soixante minutes au bain-marie à 37°C, les tubes sont centrifugés. Le surnageant séparé très soigneusement dans sa totalité (autant que faire se peut) est additionné d'1 ml d'eau distillée et sa densité optique est mesurée au photocolorimètre (Ecran vert : 524 nm).

d) Contrôles

Pour chaque série de dosages, deux contrôles sont effectués.

Le premier contrôle est celui de l'absence d'hémolyse spontanée du mélange hématies de mouton E - sérum anti-hématies de mouton A :

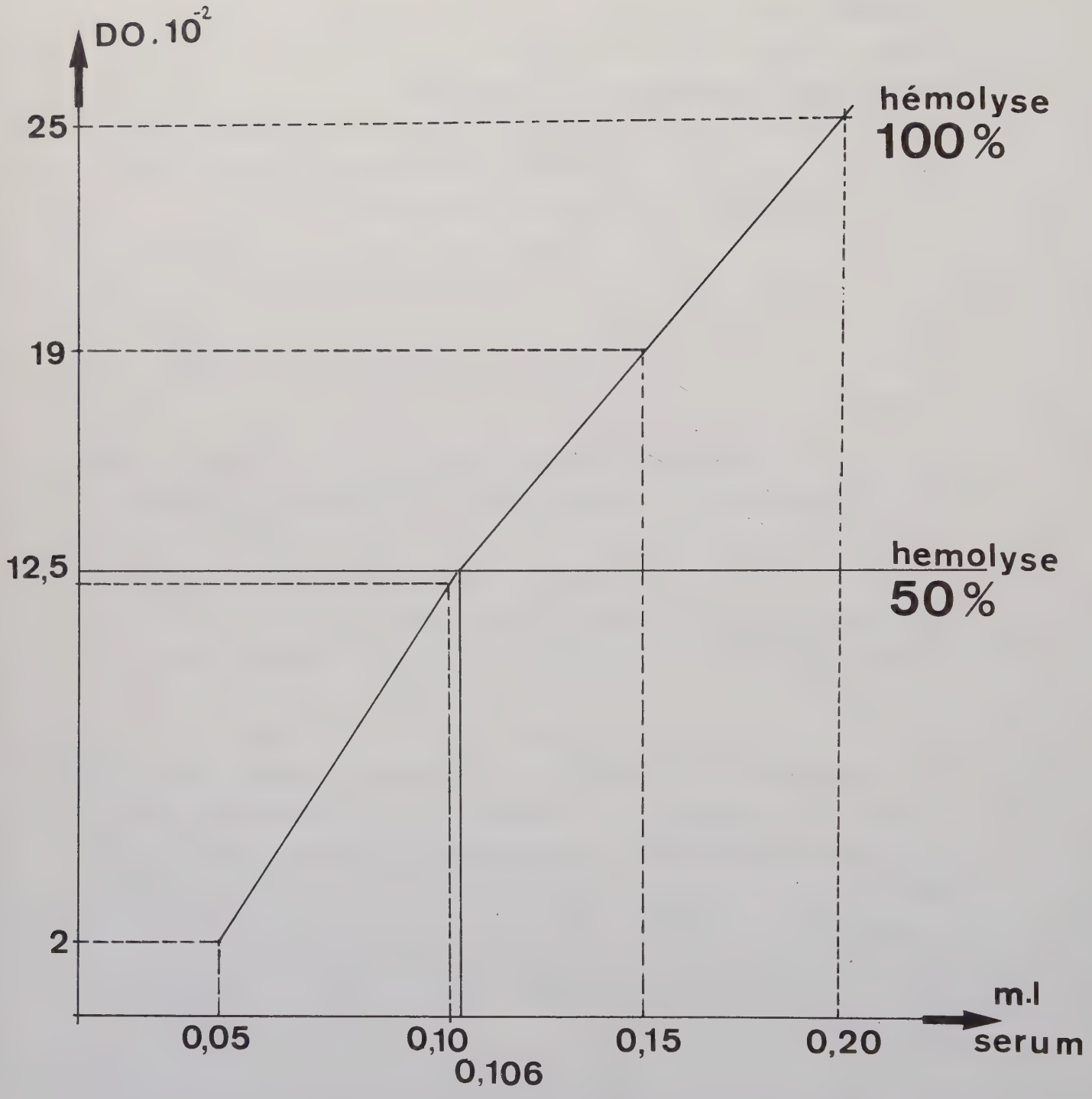
1 ml + 2 ml tampon sont mis à incuber 1 heure au bain-marie à 37°C. Après centrifugation et addition d'1 ml d'eau distillée au surnageant, la densité optique doit être nulle.

Le second contrôle est celui de l'hémolyse : afin de s'assurer de la fidélité de l'hémolyse obtenue par l'addition de complément au mélange EA, on ne peut que vérifier les densités optiques obtenues par l'hémolyse totale et par l'hémolyse de 50 % des hématies de E.A."La lecture photométrique des différentes hémolyses obtenues permet d'établir une courbe des densités optiques en fonction des doses de sérum utilisées"(fig.4 p.80), d'après BRECY.H., ANDRE.A et HARTMAN.L.-1967).

Le point où la courbe d'hémolyse tracée pour chaque sérum coupe la ligne d'hémolyse 50 % indique la quantité de ce sérum nécessaire à la lyse de 50 % des hématies du système E.A. utilisé, c'est-à-dire la quantité de sérum qui contient une unité $C'H_{50}$

Le titre d'un sérum est exprimé par le nombre d'unités contenues dans 1 ml.

FIG. 4



1/10

DOSAGE DE COMPLEMENT TOTAL D'UN SERUM

DETERMINATION DU VOLUME CONTENANT UNE UNITE $C'H_{50}$

e) Calcul

D'après les coordonées de la courbe établie, nous constatons (exemple de la fig.4 p.80) que 0,106 ml du sérum étudié, dilué au 1/10 provoque l'hémolyse 50 %.
Ce sérum contient donc par ml :

$$\frac{1 \times 10}{0,106} = 93,4 \text{ unités C'H 50}$$

La concentration minimum de sérum frais au sein de la réaction est pour le tube n° 1 (celui qui en contient le moins : 0,05 ml au 1/10) :

$$1/20 \times 1/10 = 1/210$$

La technique de ROULIER, comme les techniques qui, bien que modifiées, en dérivent, est une macrotechnique : elle nécessite l'utilisation de quantités relativement grandes de sérum pur parce que son principe est tributaire des dilutions initiales : 10 tubes pour une série sont nécessaires (autant de tubes : autant de points pour tracer la courbe) au tracé de la courbe d'un seul sérum. Ces dix tubes nécessitent 2,75 ml de sérum pur + 2,475 ml de tampon (théoriques) au minimum. En pratique, on utilise 1 ml de sérum pur pour réaliser à l'aide de 9 ml de tampon la dilution au 1/10 initiale.
Ceci implique des macrotechniques de prélèvements de sang.
La quantité minimum de sang à prélever est de l'ordre de 2 ou 3 ml.

B - Microtechniques de VARGUES :
Dosage du complément par mesure du temps d'hémolyse 50 p.100 (dosage cinétique).

./...

1 - Intérêt

Un seul tube, soit une seule cuve de réaction est nécessaire. L'hémolyse obtenue n'est pas appréciée en fin d'incubation du système mais pendant celle-ci et du début jusqu'à la fin de la lyse. C'est la mesure de la cinétique de cette lyse qui va permettre d'apprécier la dose de complément. On rapportera le temps obtenu à une série de résultats expérimentaux préalablement classés dans un tableau de référence. La rapidité de la méthode fait son intérêt.

2 - Principe

Cette technique repose sur la mesure du temps d'hémolyse 50 % (TH_{50}) dû au sérum à doser. Le temps nécessaire pour lyser la moitié des hématies sensibilisées étant fonction de la quantité de complément (de la quantité de sérum), pour exprimer le résultat du dosage en unités $C'H_{50}$ on définira comme suit l'unité $C'H_{50}$:

"Par définition, 1 unité $C'H_{50}$ est la plus petite quantité de sérum qui hémolyse 50 % des hématies sensibilisées en 30 minutes....

...L'expérience montre que si on double cette quantité (2 unités $C'H_{50}$), le temps nécessaire à la lyse de 50 % des hématies n'est plus que de 6 minutes. Si on utilise 4;7.... 15 unités $C'H_{50}$, le tH_{50} est égal à 3; 2.... 1 minute."

En déterminant donc le tH_{50} on peut déterminer la quantité de C' contenue dans une prise d'essai. Le principe du dosage est donc le même que celui de la prothrombine : plus il y a de complément, moins le temps nécessaire à la lyse est long (VARGUES,R.1967-a-)

On utilise ce dosage cinétique en se plaçant dans les conditions requises pour la définition non arbitraire de

l'unité $C'H_{50}$ (définition de l'activité-limite du complément d'un sérum). (VARGUES 1962-c-).

3 - Mode opératoire

" On met dans une éprouvette 100 ml de tampon Mayer pH 7,3. On ajoute la quantité nécessaire d'hématies de mouton (sachet d'hématies conservées : environ 0,07 ml), de manière à avoir une densité optique voisine de 0,30 (mesure turbidimétrique avec filtre de 600-650 millicrons et cuve de 10 mm. d'épaisseur utile). Cette suspension globulaire titre environ 10.000 globules par microlitre. Aux 100 ml de suspension, on ajoute 0,05 ml de sérum hémolytique. On agite. La suspension est prête pour l'emploi immédiat". (VARGUES.R.1967-a-)

On répartit 5 ml de la suspension globulaire dans des tubes à essai. On place ces tubes au bain-marie à 37°. Si l'on dispose d'une quantité importante de sérum, on pourra multiplier les essais en utilisant tous les tubes. Mais si l'on désire aller vite, ou qu'on ne dispose pas d'une quantité suffisante de sérum, on peut n'utiliser qu'un tube. Dans le cas où une série de sérums est à doser, à chaque tube correspondra un seul sérum (rapidité).

Au moment du dosage du complément d'un sérum, on ajoute aux 5 ml de suspension globulaire 0,1 ml de sérum à titrer (soit 0,02 ml de sérum pour un volume final de 1 ml) ; on agite, on déclenche la marche d'un chronomètre. On porte le contenu du tube dans la cuve du photomètre en tout ou partie (le mélange homogénéisé respectant les proportions de globules sensibilisés et de sérum du tube,ce qui importe maintenant est le remplissage suffisant de la cuve pour que son contenu fasse obstacle au faisceau). On observe le déroulement de la lyse. "Quand la densité optique montre que 50 % des globules sont lysés, on arrête le chronomètre et on note le temps (= tH_{50}). Ce tH_{50} est fonction de la quantité de complément". (VARGUES.R. 1967-b-).

4 - Calculs

Ils se font à l'aide du tableau* suivant

Temps nécessaire à la lyse 50 p.100 (tH50)	Nombre d'unités C'H50 dans 0,02 ml de sérum (volume final = 1 ml.)	Nombre d'unités C'H50 par ml de sérum (colonne 2 x 50)
30 minutes	1, unité	50 unités C'H50
10	1,5	75
6	2	100
3 min. 45 sec	3	150
3 min.	4	200
2 min. 30 sec	5	250
2 min. 15 sec	6	300
2 min.	7	350
1 min. 45 sec	8	400
1 min. 30 sec	10	500
1 min. 15 sec	12	600
1 min.	15	750

* VARGUES.R.- Le dosage du complément.- Bull. Soc. Nat. Transf. sang. TRANSFUSION.1967.T.X. N° 3. p.284

C - ULTRA MICRO-METHODE PERSONNELLE

1 - Intérêt

Pour doser immédiatement l'activité hémolytique des prélèvements spéciaux obtenus par notre microméthode de prélèvement personnelle (voir la partie I de ce chapitre), à partir d'une microgoutte de sang ayant exsudé directement dans le tampon Mayer pH 7,3 dilué au 1/5 et 90 minutes seulement, il fallait mettre au point une méthode de dosage à la mesure de ces prélèvements.

L'intérêt majeur de notre microméthode consiste dans le contrôle des paramètres qui conccurent au vieillissement ou à la dénaturation des éléments biologiques de la réaction d'hémolyse. Le contrôle des conditions d'expérience dans une réaction biologique ne se limite pas à celles qui s'exercent lors de la réaction proprement dite. La cinétique de préparation des réactifs labiles ayant une incidence sur la cinétique de l'immune-hémolyse in vitro. Le prélèvement de l'un de ces réactifs (C') est extemporané.

2 - Préparation de la suspension d'hématies dans des conditions bien déterminées

Pendant les 90 minutes nécessaires à l'exsudation de notre microgoutte de sang dans le tampon, on procède à la préparation des autres éléments de la réaction d'hémolyse.

a) Matériel

Les hématies de mouton (en sachet polyethylène de 5 ml de suspension) sont fournies par l'Institut Pasteur.

Le compte-goutte qui sert à les prélever est muni d'un tube en polyethylène. Il est identique à ceux que nous avons construit pour le prélèvement de sang et, comme eux, ne sert qu'une fois.

Le tampon Mayer-Lévine dilué au 1/5 à partir de la solution-mère (produit Ser-Pasteur) a été décrit dans la partie I de ce chapitre.

Le sérum hémolytique : anti-sérum de lapin antistromas d'hématies de mouton est livré avec un compte-goutte spécial (1 goutte : 1/80 ml entre 15 et 20°C), par l'Institut Pasteur.

Le photomètre enregistreur type Spila-Leres est toujours "chaud" sous-tension. Il est réglé sur 630 m/u et utilisé en turbidémètre.

Des cuves en quartz de 10 mm d'épaisseur utile sont étalonnées et sont choisies identiques.

b) Mode opératoire

Le sachet d'hématies est frais du jour et sort du réfrigérateur (+ 4°C) pour son utilisation extemporanée. On brasse avant ouverture et sans faire mousser pour homogénéiser. On prélève à l'aide de notre compte-goutte assez de suspension pour laisser tomber au fond d'une éprouvette de 100 ml mouillée au tampon, deux gouttes.(2 x 0,02 ml environ).

Ces 0,04 ml de suspension-mère d'hématies sont alors brassés par 100 ml de tampon. On homogénise par trois transvasement dans un erlen. La suspension obtenue est très "claire" et sédimente très lentement (trop lentement pour perdre son homogénéité) : Des échantillons testés en densité optique sont reproduits identiques $\geq$ 0,3 D.O pendant plusieurs heures ce qui dépasse la durée totale des expériences qui suivront. De plus, la tenue de cette valeur confirme l'absence relative de lyse. C'est-à-dire que la D.O. reste voisine de 0,3 mais un peu supérieure. On ajuste à D.O $\equiv$ 0,3 en ajoutant du

tampon de 1 ml en 1 ml.

A cette densité optique obtenue à 630 m / μ avec une cuve de 10 mm d'épaisseur utile, la suspension d'hématies titre environ 10.000 hématies au microlitre (p. 83) (VARGUES. R. 1967-b-).

3 - Sensibilisation optimale de cette suspension "0,3 D.O" dans des conditions bien déterminées.

a) Matériel :

- fiole jaugée à 100 ml
- sérum hémolytique : fourni par l'Institut Pasteur. C'est un sérum de lapin (espèce FORSSMAN NEGATIVE) anti-stromas d'hématies de mouton. Ce sérum hyperimmun est fourni par un compte-gouttes spécial (1 goutte = 1/80 ml entre 15 et 20° C). Ce sérum est décomplémenté par chauffage à 60° C pendant 10 mn.
- la suspension ajustée à D.O. = 0,3.

b) Mode opératoire

On prend exactement 100 ml (fiole jaugée) de la suspension versés dans la fiole contenant 4 gouttes (4 X 1/80 ml) du sérum hémolytique. On mélange. Les hématies sont ainsi sensibilisées au taux optimal $\frac{1}{2000}$ environ. On se trouve ainsi dans la zone asymptotique à l'axe des taux de complément dans la courbe de suppléance hémolysine-complément (loi de suppléance de Rodet et Favre (ROULIER R. 1950) FASQUELLE R. 1965-b) (RAYNAUD M. 1971) (VARGUES R. 1962-c-) (Voir la figure N° 5 - p. 88).

4 - Concentration des hématies au sein de la réaction. Pourquoi "10.000 globules au microlitre" ?

Ce chiffre maximal correspond à l'expérimentation. En effet : toute autre condition technique demeurant constante, la quantité de sérum nécessaire à la lyse de 50 % des hématies décroît avec le nombre de ces hématies jusqu'à une dose maximale, comme l'indiquent les chiffres suivants (tableau N° 1, p. 89) (VARGUES R. 1962-C-) - Voir figure N° 6 - p. 90.

DETERMINATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE L' HEMOLYSINE

L'ACTIVITE DU COMPLEMENT AUGMENTE AVEC LE TAUX DE L'ANTI-CORPS HEMOLYTIQUE ; autrement dit il est possible de réduire la quantité de complément à condition d'augmenter la sensibilisatrice, C'EST LA LOI DE SUPPLEANCE DE RODET ET FAVRE.

INTERET :

1 : pour augmenter la SENSIBILITE DE NOS DOSAGES DE COMPLEMENT (sur sérum pauvre en complément hsmolytique : poulet, embryons), nous avons choisi un sérum hémolytique hyperimmum et nous l'avons utilisé peu dilué : 1/2000.

2 : pour assurer la reproductibilité de nos titrages de complément, nous diluons ce sérum hémolytique dit de type I de façon à respecter nos

COORDONNEES D' EXPERIMENTATION (H. 50 % , 1/2000)

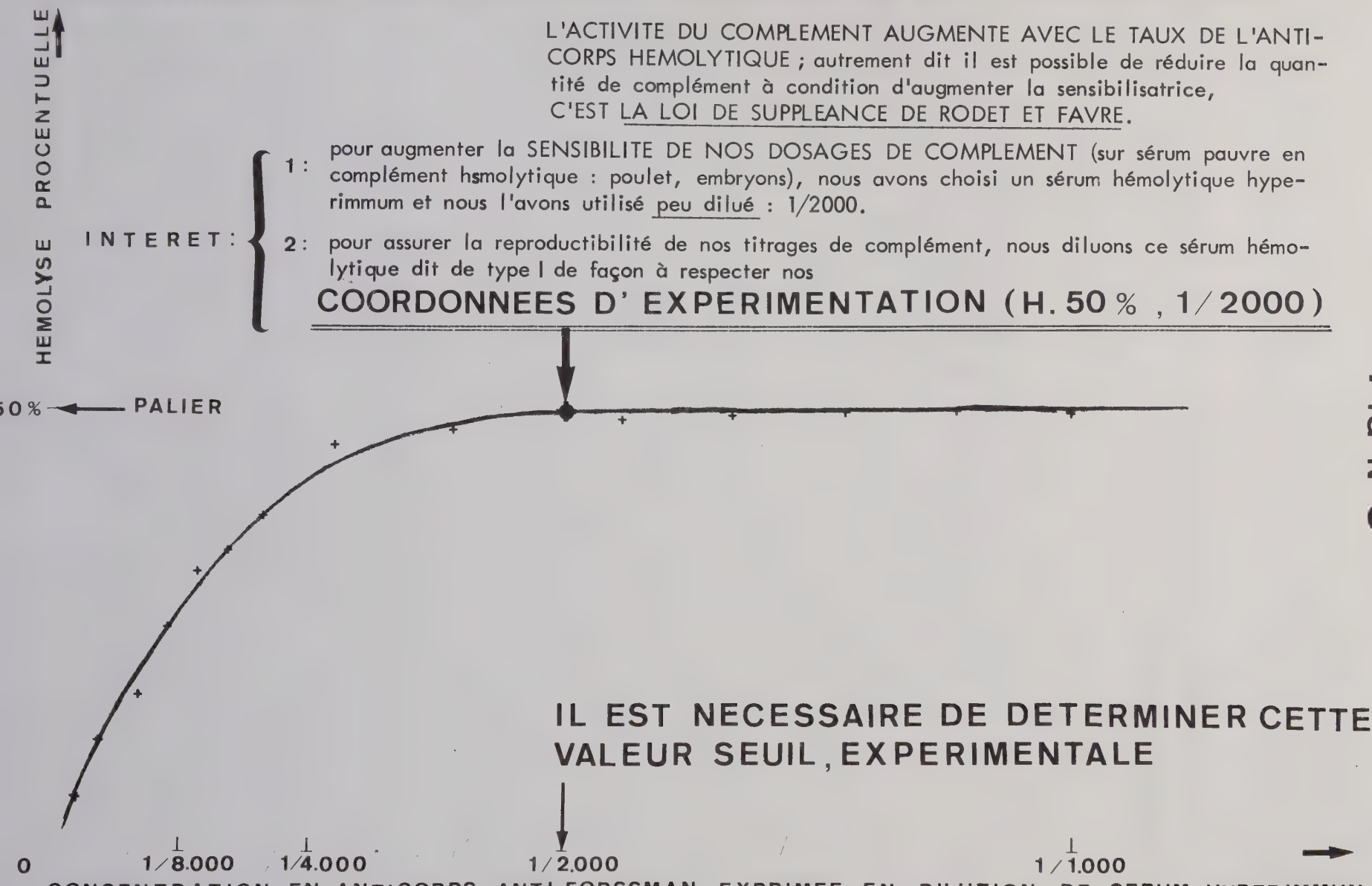


FIG N° 5

TABLEAU Nº 1

CONCENTRATION DES HEMATIES AU SEIN DE LA REACTION

Nombre d'hematies dans 1 microlitre (Volume final de la réaction)	Quantité de sérum normal utilisée par mm^3. (Volume final de la réaction	Nombre d'unités 50% Unités VARGUES-AUDRAN
250.000	0,0135	72
125.000	0,009	110
62.000	0,005	200
30.000	0,004	250
15.000	0,0025	400
10.000	0,002	500
7.000	0,002	500
4.000	0,002	500
2.000	0,002	500
1.000	0,002	500

LIMITE optimale D'ACTIVITE

VARGUES. R. et AUDRAN. R. -- " Proposition d'une définition non arbitraire de l'unité de complément hémolytique. (Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol. 1962, VII, 1126)
1962

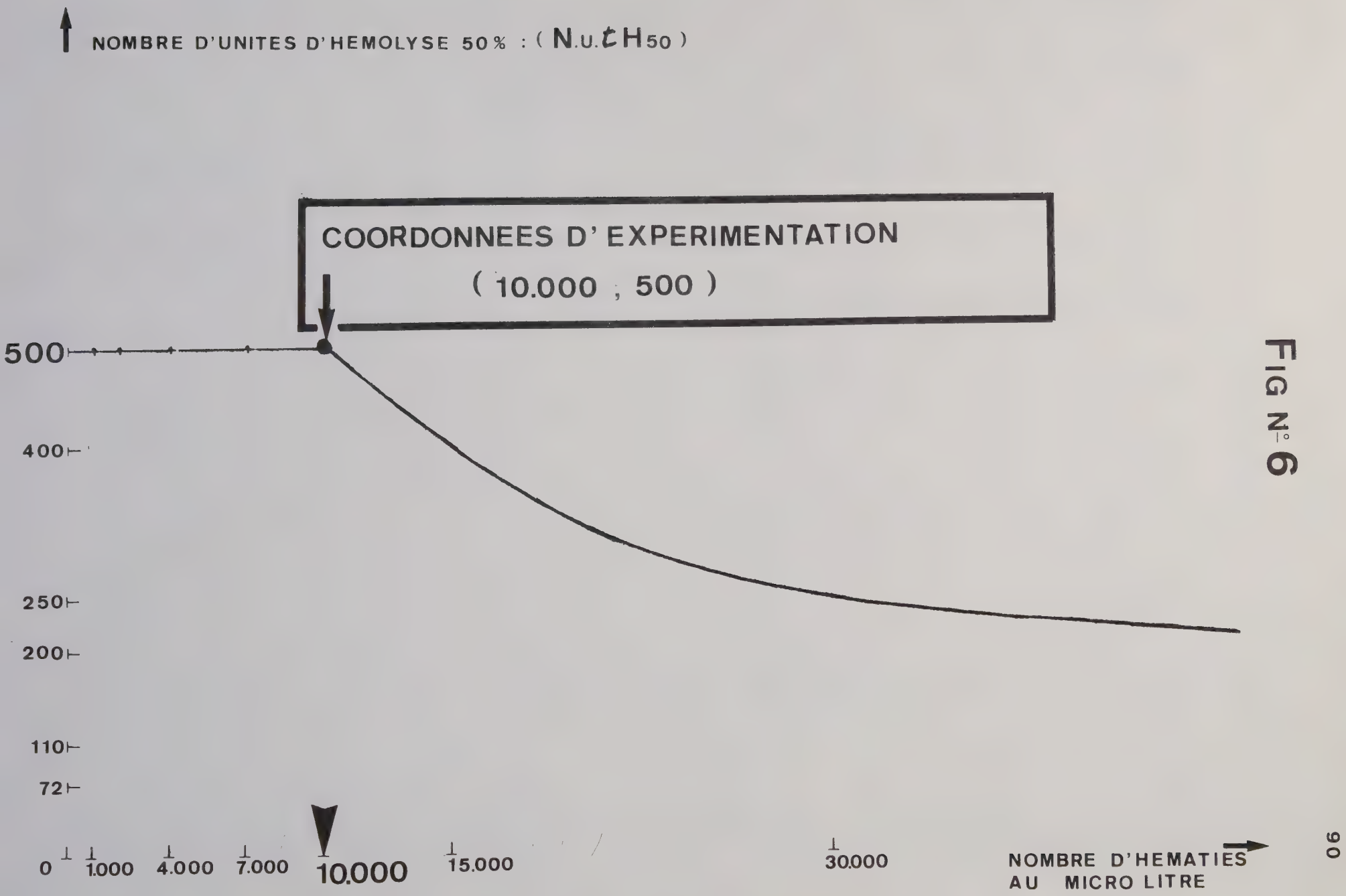

NOMBRE D'UNITES D'HEMOLYSE 50 % : (N.U.tH50)
COORDONNEES D' EXPERIMENTATION
(10.000 ; 500)
500
400
250
200
110
72
0
1.000
4.000
7.000
10.000
15.000
30.000
NOMBRE D'HEMATIES
AU MICRO LITRE

FIG N° 6

" Par conséquent, il existe une limite à l'activité complémentaire hémolytique des sérums, limite qui au dessous du chiffre de 10.000 hématies par microlitre, est indépendante du nombre de ces globules. La même observation est faite si on étudie le temps nécessaire à la lyse des hématies sensibilisées, la quantité de complément étant fixe : le temps nécessaire à la lyse de 50 p.100 des globules décroît en même temps que le nombre des globules rouges, mais devient constant quand le nombre des hématies est égal ou inférieur à 10.000 au microlitre (concentration en hématies du volume de réaction).

Ces observations se limitent au dosage de l'activité du complément sur les hématies de mouton et non d'une autre espèce animale. Il est indifférent d'utiliser des hématies de telle ou telle des races de moutons existant en France. La sensibilité à la lyse a été recherchée dans cinq races de moutons différentes. Le mode de conservation des hématies est sans grande importance' (VARGUES R). 1962 - C.

5 - Titrage du complément avec un seul tube par détermination du temps d'hémolyse 50 p.100. Opacimétrie des globules rouges non lysés.

- Matériel

La suspension d'hématies sensibilisées est prête pour l'emploi immédiat. Le surnageant (au 1/30 environ) du sérum de cobaye, on l'a vu, attend à + 4°C. Le photomètre est "chaud". L'enregistreur est en marche (le défilement du papier a débuté lors des préparatifs). Des repères sont inscrits en abscisses par l'envoi d'un signal et marquent les étapes standardisées de l'opération, assurant le contrôle de la cinétique de préparation des réactifs. Ainsi ne seront comparées que les réactions dont la cinétique de préparation des réactifs est la même. Les cuves quartz de 10 mm. d'épaisseur utile, étalonnées au préalable et choisies identiques, sont placées dans un bain-marie à l'aide d'un portoir spécial.

Elles sont presque entièrement immergées et y ont séjourné assez longtemps pour que 37°C leur soient uniformément communiqués : il n'y a pas de condensation à l'intérieur de ces cuves sèches en attente. Un chronomètre, indépendant du système d'horlogerie réglant la vitesse de déroulement du papier enregistreur, servira à vérifier les concordances des différentes vitesses de déroulement à sélectionner sur l'enregistreur. Il servira, en outre, à mesurer des durées d'incubation, lesquelles sont simultanément reproduites sur l'enregistrement par l'envoi de signaux abscisse lors des opérations hors de la fosse de lecture et par l'envoi de signaux sur courbe-densité lors des mesures. Une pipette de précision (3 millilitres) servira à distribuer la suspension d'hématies sensibilisées.

- Mode opératoire

On verse 3 gouttes* (3 x 0,02 millilitres environ) au fond des cuves du photomètre placées au bain-marie à 37°C. On ajoute dans chaque cuve 3 millilitres de la suspension (ajustée à 0,3 D.O, puis sensibilisée) à l'aide de la pipette de précision. On réalise ainsi le mélange homogène par la différence des volumes versés et l'ordre d'introduction dans les cuves : on voit que le complément* est introduit le premier, que ce complément provienne d'une dilution de sérum obtenu par les méthodes classiques d'exsudation ou qu'il provienne de notre microméthode d'exsudation conditionnée, il sort du réfrigérateur (+ 4°C) extemporanément et dans le cas de nos microprélèvements 2 heures exactement après ponction chez l'animal.

Pour chaque cuve, un signal enregistré marque le temps initial de la réaction qui s'inscrit sous nos yeux sous forme d'une courbe sigmoïde après un temps de latence dont on profite pour :

1) laisser les cuves à 37°C un certain temps : 2 minutes chronométrées ;

2) sortir ensemble (portoir) les cuves du bain-marie ;

3) les essuyer une à une et les introduire dans le barillet de mesure.

Une cuve n'ayant pas reçu de sérum de cobaye (cuve témoin) donnera la dérive due à la lyse d'hématies (lyse spontanée).

On passera en position de lecture (à intervalles de temps réguliers) les cuves dans un ordre déterminé et on pourra, en fin d'expérience, lire les tH_{50} respectifs qui se sont inscrits lors de l'enregistrement de la chute de densité optique (opacimétrie des globules rouges non lysés) depuis la valeur de la densité optique initiale (maximum = 0,3 D.O), correspondant au palier du temps de latence, jusqu'à la valeur finale (lyse achevée : D.O $\longrightarrow$ 0 asymptote).

Le point d'inflexion des sigmoïdes est voisin de la demi-hémolyse : ce tH_{50} est fonction de la quantité de complément s'il est reproductible.

- <u>Concentration du complément au temps initial de la réaction</u> (... prélèvements obtenus par notre microméthode)

On peut chercher à évaluer cette concentration et donner un ordre de grandeur. Le surnageant, on l'a vu, est au grand maximum au 1/30 du sérum pur. (En effet, l'exsudation contrôlée, standardisée, de seulement 90 minutes, permet de situer le volume de sérum qui exsude en dessous de la moitié du volume de sang total introduit).

3 x 0,02 ml $\longrightarrow$ 0,06 ml de surnageant au 1/30 et 0,06 ml de surnageant + 3 ml de suspension globulaire font :

$$1/30 \times 1/51 = 1/1530$$

.... <u>à l'examen des courbes expérimentales obtenues</u> :

Ces courbes ont une forme sigmoïdale. Il y a un temps de latence qui dure au plus 10 minutes, puis la lyse se manifeste. La vitesse de la lyse est maximum au point d'inflexion puis décroît pour devenir nulle quand toutes les hématies sont détruites... ou quand le complément disponible est utilisé si la dose est limite (VARGUES R.-1967-d-).

Or, nous obtenons toujours l'hémolyse totale alors que la cuve témoin reste en palier dérive très faible. De plus : si, en fin d'expérience, on ajoute dans les cuves "lysées" des hématies sensibilisées, on constate que la lyse reprend.

- Conclusion :

Avec 10.000 hématies au microlitre, sensibilisées 1/200 par du sérum hémolytique anti-hématies de mouton, le complément est en excès. Nous n'avons pas cherché à descendre au taux limite de complément qui lyserait toutes les hématies, c'est-à-dire les 30.000.000 d'hématies introduites dans les 3 ml de suspension (10.000 hématies au microlitre) sans excès : dans ces conditions les résultats ne sont pas reproductibles.
La technique ne contrôle plus la température à la sortie du bain-marie car nous n'utilisons pas de cuves thermostatées ou d'auto-analyseur automatique qu'on réserve aux dosages multiples "en série" et dont la précision est plus statistique qu'individuelle. Les 3 millilitres de suspension dont on suit la lyse, laquelle débute après un temps de latence qui excède le temps nécessaire au passage de la cuve du bain-marie à la fosse de lecture, ne restent pas à 37°C : la masse en eau, la température du laboratoire (environ 23°C), la température de la fosse de lecture de l'appareil "chaud" (environ 29°C) concourent à faire chuter cette température initiale depuis la fin du temps de latence (palier DO = 0,3), jusqu'à l'hémolyse totale (asymptote $\longrightarrow$ D.O = 0). Mais ces conditions sont constantes d'une mesure à l'autre et nous verrons que les résultats sont reproductibles, en dépit de ce paramètre mal contrôlé pourvu que les réactions n'excèdent pas 30 minutes ($^{1}H_{50}$ = 15 minutes).

Nous nous sommes placés, ce faisant, dans les conditions mêmes de la définition de l'unité $C'H_{50}$ proposée par VARGUES et AUDRAN (VARGUES R. 1962-c-) les concentrations :

10.000 G.R./$\mu\ell$ (0,3 D.O. sous 630 mμ)
Avec sérum hémolytique au 1/2000
l'incubation de la suspension à lyser : 37° C

et surtout le rapport des volumes de suspension à lyser V et de sérum ajouté v

$$\frac{v}{V} = \frac{1}{51}$$ v = sérum pur (VARGUES R. 1967-b-)

Avec cette différence que pour nous v est déjà dilué (au 1/30 environ) lors de l'exsudation directe dans le tampon de Mayer-Lévine à pH 7,3. Mais cette exsudation là est plus physiologique vis-à-vis du complément que l'exsudation classique du sang recueilli sans tampon de dilution : en effet, le tampon apporte les ions Ca^{++} et Mg^{++} aux concentrations et à une force ionique recherchées par leurs auteurs en vue de protéger, de favoriser l'activité du complément des sérums obtenus de façon classique. En utilisant ce tampon dès l'obtention de ce sérum (puisque l'exsudation se fait dans ce tampon), on évite pour le moins la perte d'activité. De plus, le complément qui se trouve ainsi dilué l'est dans des conditions standardisées : rapport du volume de sang au volume de tampon constant, temps d'exsudation fixé à 90 minutes à température constante (37° C) - conservation courte à + 4° C (30 minutes) et dosage immédiat (2 heures exactement après ponction du sang).

- Les résultats de VARGUES sont résumés par lui-même dans le tableau ci-dessous :
(VARGUES 1967 R. 1967-b-)

Temps nécessaire à la lyse de 50 p.100 des hématies tH_{50}	Nombre d'unités $C'H_{50}$ dans 0,02 ml de sérum pur (volume final : 1 ml	Nombre d'unités $C'H_{50}$ par ml de sérum (x par 50 les valeurs de la colonne précédente)
30 min.	1 Unité	50 Unités
10 -	1,5	75
6 -	2	100
3 min. 45 sec	3	150
3 min.	4	200
2 min.30 -	5	250
2 min.15 -	6	300
2 min.	7	350
1 min.45 -	8	400
1 min.30 -	10	500
1 min.15 -	12	600
1 min.	15	750

Avec 0,02 ml de sérum pur pour 1 ml de suspension à lyser (0,3 D.O) la réaction est si rapide que quelques secondes suffisent. (Sérum de cobaye)

Et, en faisant dans notre technique 0,06 ml de "sérum dilué au 1/30e.", on obtient en ajoutant 3 ml de la suspension, un tH_{50} de 14 ou 15 minutes régulièrement. (Sérum de cobaye)

D'après le tableau de VARGUES, il y aurait dans nos 0,06 ml entre 1 et 1,5 unités $C'H_{50}$ (1,3 peut-être).

Le nombre d'unités $C'H_{50}$ par ml de sérum de cobaye "au 1/30ème".

1,3 x 50 = 65

est rapporté au sérum pur :

65 x 30 = 1950 unités $C'H_{50}$ par ml de sérum chez notre cobaye

Or, VARGUES trouve pour le sérum de cobaye un taux de 1500 $\pm$ 260 sur 47 individus (VARGUES R. 1962-e-)

V - PREPARATION d 'IMMUN - SERUMS ANTI-ORGANES et d'IMMUN-SERUMS ANTI-SERUMS TOTAUX

A - INTERET

B - PREPARATION du MATERIEL

C - MODE OPERATOIRE

1) Immun-sérums anti-sérums totaux

(a) immun-sérum de lapin anti-sérum frais de cobaye
immun-sérum de lapin anti-sérum frais de poulet

(b) immun-sérum de lapin anti-sérum vieilli de cobaye
immun-sérum de lapin anti-sérum vieilli de poulet

2) Immun-sérums anti-organes

a) immun-sérum de lapin anti-thymus de poulet

b) immun-sérum de lapin anti-bourse de fabricius de poulet.

A - INTERET -

1) - Comme l'hydrazine, le vieillissement a sur les sérums frais une action spécifique : il transforme la Beta-1-C globuline du complément en Beta-1-A globuline inactive laquelle n'existe qu'in vitro.

Comme ces deux globulines ont à l'éléctrophorèse une vitesse de migration différente, on peut les séparer sur sérum modérement vieilli (une semaine maximum à + 4° C) lequel contient lesdeux, et révéler deux arcs de précipitation immunoélectrophorétique distincts à l'aide d'un anti-sérum préparé par immunisation de l'animal contre un sérum identique à celui qu'on analyse et comme lui, assez vieux pour contenir de la Beta-1-A et pas assez pour ne plus contenir de la Beta-1-C.

Mais il y a mieux à faire si l'on veut savoir lequel des deux arcs de précipitation immunoélectrophorétique obtenus correspond à la Beta-1-C : il suffit de préparer des immun-sérums par immunisation de l'animal contre du sérum frais (si l'on veut obtenir des anticorps anti-Beta-1-C à l'exclusion des anticorps anti Beta-1-A) et à l'inverse, contre du sérum suffisamment vieilli pour obtenir des anticorps anti-Beta-1-A, à l'exclusion des anticorps anti-Beta-1-C. Reste à pratiquer l'électrophorèse, soit sur sérum frais, soit sur sérum suffisamment vieilli,

.../...

ou traité à l'hydrazine, pour y transformer toute la Bêta-1-C en Bêta-1-A.

L'antigène étant frais, et l'immun-sérum étant riche en anticorps anti-Bêta-1-C : on obtiendra, en outre, une densité de précipitation immune importante (anti-Bêta-1-C - Beta-1-C).

Si l'antigène est vieilli et que l'immun-sérum est riche en anti-corps anti-Beta-1-A : on obtiendra, en outre, une densité de précipitation immune importante (anti-beta-1-A — Beta-1-A).

On peut aussi contrôler la spécificité de nos deux immuns sérums en les permutant :

Si l'antigène est frais et que l'immun-sérum utilisé est celui qui correspond à l'immunisation de l'animal contre du sérum suffisamment vieilli ou traité par l'hydrazine, il n'y aura pas d'arc de précipitation immunoélectrophorétique en position Beta-1-A, mais il n'y aura pas de précipitation immuno-électrophorétique en position Beta-1-C non plus.

De même, si l'antigène est un sérum suffisamment vieilli et que l'immun-sérum utilisé est celui qui correspond à l'immunisation de l'animal contre du sérum frais, il n'y aura pas d'arc de précipitation immunoélectrophorétique en position Beta-1-C, mais il n'y aura pas de précipitation immunoélectrophorétique en position Beta-1-A non plus.

De plus, à côté de la mise en évidence de Beta-1-C globuline sur sérum frais au moyen d'immun-sérum monovalent anti-Beta-1-C, l'immun-sérum anti-sérum vieilli a sur le premier l'avantage de déceler la Beta-1-A là ou il y avait donc de la Beta-1-C (avant vieillissement ou dénaturation).

Ces immuns-sérums anti-sérum frais ou anti-sérum vieilli n'existant pas dans le commerce, il était intéressant de les préparer.

2 - La préparation d'immuns-sérums anti-organes a pour but de rechercher les parentés antigéniques entre thymus et Bourse de$ Fabricius et plus particulièrement de comparer leur richesse respective en anti-corps anti Beta-1-C pour corrohorer nos résultats en immunofluorescence quantitative. Mais avant, et pour vérifier la spécificité de nos résultats en immunofluorescence qualitative (par la technique de Coons dite " immunofluorescence directe "), des essais de négativation de la fluorescence spécifique à l'aide de nos anti-sérums anti-thymus ou anti-Bourse de Fabricius viendront s'ajouter aux négativations par l'hydrazine et par un sérum anti-IG de poule avant épreuve en immunofluorescence à l'aide du sérum conjugué anti Beta-1-C.

B - PREPARATION du MATERIEL

La préparation des antigènes à injecter pour l'immuni-

.../...

sation est simple lorsqu'il s'agit de sérums. Nous avons vu : (paragraphe I = isolement du SERUM EN VUE DE PRESERVER SA FRAICHEUR- A: Macrométhode classique : ponction veineuse) que, pour réduire le temps d'exsudation pendant lequel de la Beta-1-C pourrait (globuline labile) se dégrader en Beta-1-A, on pratique des ponctions d'un volume important de sang de façon à pouvoir séparer un volume de sérum suffisant, sans attendre que tout le sérum ait exsudé; il va de soi que pour préparer le sérum vieilli, ces précautions sont inutiles et qu'il suffit après l'exsudation complète (24 heures à la température du laboratoire) de laisser vieillir le sérum (séparé par centrifugation ménagée) trois semaines à + 4° C.

La préparation des antigènes à injecter pour l'immunisation est plus complexe lorsqu'il s'agit d'organes broyés tels que le thymus ou la bourse de Fabricius. Le thymus des oiseaux étant multilobé et la bourse de Fabricius (dont il n'existe pas d'homologue chez les autres vertébrés) étant à débarrasser préalablement de sa thèque musculeuse. Nous avons exposé au paragraphe II :

— PREPARATION d'ORGANES chez l'EMBRYON et AU-DELA de l'ECLOSION

3 : Prélèvement d'organes chez l'adulte (à broyer ou à congeler pour coupes)—:

a) la technique d'obtention de broyats de pulpe de thymus

.../...

(éclatement des cellules), sous forme d'une suspension rose à injecter pour immunisation.

b) la technique d'élimination du Cortex Fabricien, et de broyage de médullaires Fabriciennes qui fournit une suspension d'un blanc laiteux à injecter pour immunisation.

Tous les animaux à immuniser sont des lapins "neufs", c'est-à-dire, vierges de toute immunisation antérieure. Les sérums à injecter sont des sérums de cobayes de 500 grs mâles ou de poulets de 3 mois.

C - MODE OPERATOIRE

1 - Immun-sérums anti-sérums totaux

a) immun-sérum de lapin anti-sérum frais de cobaye
immun-sérum de lapin anti-sérum frais de poulet

Les animaux donneurs de sérums frais sont sacrifiés pour obtenir une quantité importante de sang sans avoir à attendre l'exsudation totale. (Nous avons vu pourquoi). On fixe à 2 heures le temps d'exsudation ce qui autorise des prélèvements de 2 ml. de sérum frais pour 10 ml de sang traités. Le sérum doit être immédiatement injecté aux lapins après dilution volume à volume dans de l'eau physiologique et l'adjuvant de Freund en émulsion.

Chaque lapin reçoit en intra-veineuse à la première série d'injections 2 ml du mélange sérum-adjuvant de Freund et deux fois par semaine pendant 3 sem. Après une période dite de " repos ", soit 1 mois, le lapin reçoit, à la seconde série

d'injections de sérum frais, 2 ml de sérum frais pur(sans adjuvant) deux fois par semaine pendant 3 semaines - l'immunisation dure donc :

4 + 4 + 3 = 11 semaines.

puis, après une semaine de repos, on pratique les saignées des lapins immunisés. Certains immun-sérums seront testés en immuno-électrophorèse immédiatement, c'est-à-dire frais; d'autres attendrons à - 25 ° C (congélation).

(b) Immun-sérum de lapin anti-sérum vieilli de cobaye
Immun-sérum de lapin anti-sérum vieilli de poulet

Pour préparer les immun-sérums anti-sérums vieillis, les sérums de Cobaye ou de poulet, obtenus par exsudation classique de 24 heures, sont laissés à + 4° C. 3 semaines.

Des lots de sérum à vieillir, numérotés et datés, sont préparés tous les 3 jours pendant 4 semaines.

De façon à disposer de 3 jours en 3 jours de sérums vieux de 3 semaines, la première injection commence 3 semaines après la la ponction correspondant au premier lot de sérum. La première série d'injections comprend 11 injections en intra-veineuse du mélange sérum vieilli - adjuvant de Freund (volume à volume) de 2 ml. La durée de cette première période d'immunisation est donc d'un mois.

Après un mois de repos, les lapins reçoivent tous les 3 jours, pendant 3 semaines, 2 ml de sérum vieilli pur préparé

.../..

3 semaines auparavant (8 injections de rapel). Puis, après une semaine d'arrêt, on pratiquera les saignées des lapins immunisés - les immuns sérums obtenus seront congelés et conservés à - 25°C. des échantillons seront immédiatement testés en immuno-électrophorèse.

- 2 - IMMUNSERUMS ANTI-ORGANES

Parmi les méthodes d'immunisation possibles qui furent adoptées pour la préparation de sérums anti-lymphocytaires nous avons choisi celle qui fut proposée par LEVEY à MEDAWAR (LEVEY R.H. 1966) : le " TWO PULSE " qui consiste à injecter par voie intra-veineuse deux fois à quinze jours d'intervalle, et à faire une saignée mortelle une semaine après la deuxième injection, et ce chez le lapin.

a) Nous avons donc injecté à un lapin, deux fois, et à 15 jours d'intervalle, 2 ml de suspension de fractions subcellulaires thymiques (dont des thymocytes) dont la concentration en protéines a été ajustée à 25 % à l'aide d'eau physiologique stérile.

b) Nous avons réglé à 25 % la concentration en protéines de la suspension de broyat de médullaires de follicules fabriciens, et injecté, deux fois (à quinze jours d'intervalle), 2 ml de suspension à un autre lapin. Les lapins ont été saignés une semaine après la deuxième injection.

VI - TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE

A - INTERET

B - PRINCIPE

C - COUPES A LA CONGELATION

D - TRAITEMENT DES COUPES EN VUE DE RÈVÉLER L'ANTIGENE RECHERCHÉ : TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE

E - OBSERVATION DES PREPARATIONS

F - TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE QUALITATIVE :

- Recherche de la Bêta-1-C globuline du plasma et identification de la première formation in situ du facteur Bêta-1-C

1) sur des coupes d'intestin d'embryon de poulet

2) sur des coupes intéressant tout l'embryon, avec contrôle d'identité histologique au moyen de colorations

3) sur des coupes de la Bourse de FABRICIUS

4) sur des coupes du THYMUS

G - TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE QUANTITATIVE :

Mesure de la densité de population cellulaire Bêta-1-C formatrice

1) sur des coupes du THYMUS

2) sur des coupes de la Bourse de FABRICIUS.

VII - METHODES D'ABSORPTION IMMUNOLOGIQUE OU DE MODIFICATION CHIMIQUE SUR COUPES A CONGELATION AVANT EPREUVE D'IMMUNOFLUORESCENCE

A - AVEC HYDRAZINE

B - AVEC SERUM ANTI-THYMUS

C - AVEC SERUM ANTI-BOURSE DE FABRICIUS

D - AVEC SERUM ANTI-IG POULE

VI - TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE

A - Intérêt

Correspondant à 2 grammes par litre, soit plus de 2p.IOO des protéines sériques totales, la bêta-I-C globuline est de loin la fraction sérique quantitativement la plus importante des 9 fractions connues du complément (Vargues. R. I967-f-); (Kohler. L.B. I967.); (Muller-Eberhard. H.J. I969.) la bêta-I-C globuline est aussi la plus antigénique (M= 240.000; ug/ml= I.200.) Mais la bêta-I-C globuline est aussi la plus labile puisqu'en fonction du temps le sérum invitro perd son activité complémentaire, la bêta-I-C se dénaturant en se transformant en bêta-I-A globuline (Muller-Eberhard. H.J. I960-I965.); (Zimmer. M.J. I960-I96I.); (Grabar. P. I960.); (Kohler. L.B. I967.)

Reposant sur la séparation préalable du sérum à partir du sang prélevé, les techniques de dosage ou de dépistage du complément (immune-hémolyse immunoélectrophorèse) et surtout les techniques de dosage de la bêta-I-C globuline (Klemperer. M.R. I965.); (Sandor. G. I967.); (Lundh. B. I964.) impliquent une dénaturation inévitable d'une partie au moins de la bêta-I-C.

Comment éviter davantage le " vieillissement " du sérum ? Comment reculer encore la limite qui sépare la bêta-I-C de ce qui en reste in vitro ? Le mieux est sans doute de laisser le complément dans le plasma où il se trouve in vivo, de laisser le sang dans les vaisseaux et, ces derniers, dans les tissus qu'ils irriguent en fixant le tout sur place avant d'entreprendre la recherche de la bêta-I-C fixée.

Par la congélation immédiate de tissus d'organes ou d'embryons, on réalise un " instantané sur le vivant " ce qui manquait aux techniques précédentes.

De plus, la bêta-1-C globuline étant très antigénique, on trouve dans le commerce (nous l'avons vu) des sérums monovalents anti-bêta-1-C globuline très spécifiques dont on a déjà utilisé un exemplaire en immunoélectrophorèse pour déceler la présence de la bêta-1-C antigène. Il existe, en outre, les mêmes sérums monovalents anti-bêta-1-C globuline... marqués (à l'isothiocyanate de fluorescéine ou bien au chlorure d'amino-naphtaline sulfonyl, à fluorescence jaune citron pour le premier et verte pour le second) pour étude en immunofluorescence. Les coupes fines à la congélation (cryostat) autorisent la recherche microscopique de la bêta-1-C globuline fixée (antigène) dès que les anti-corps spécifiques (anti-bêta-1-C) de l'immun-sérum marqué y sont déposés. Or, la congélation de tissus, organes ou embryons in toto suit immédiatement leur prélèvement rapide. La fixation à l'acétone est courante et préserve les propriétés antigéniques (in situ) et prend en quelque sorte la relève du froid seul. En effet, la fixation de l'acétone se fait à froid (-25° c) immédiatement après décongélation et séchage rapides des coupes effectuées à 2 microns. De plus, étant donné que la réhydratation des coupes se fait dans un tampon approprié et est immédiate, qu'elle est suivie du dépôt de l'immun-sérum marqué, la fixation spécifique de l'antigène recherché ne se fait plus sur un substrat (sérum) en voie de dégradation (comme c'était le cas lors de l'immune-hémolyse des erythrocytes de mouton sensibilisés ou lors de la précipitation spécifique en double diffusion) mais sur un matériel fixé dans le temps et l'espace dès son prélèvement.

L'immunofluorescence en tant que technique histologique permet ici l'étude cytophysiologique de quantités de bêta-1-C globuline qui échappaient aux techniques de dosage sur sérum et prend ainsi la relève des investigations sur le compartiment sérique en les complètant par une étude cytologique in vitro beaucoup plus sensible et spécifique, nettement plus près des conditions physiologiques in vivo.

B - Principe

Etant donné son antigénicité et son importance, par rapport aux autres fractions du complément, la bêta-1-C servira de "traceur" du complément sérique lorsque sur les coupes les lumières des vaisseaux seront fluorescentes (plasma). En outre, les cellules secrétrices de bêta-1-C globuline qui seront coupées nous éclaireront peut-être sur l'origine du complément formé, mais surement sur l'origine de sa fraction bêta-1-C.

L'application la plus féconde de la fluorescence aux possibilités de diagnostic ou d'identification est sans doute l'immunofluorescence. Sa mise en oeuvre découle des travaux de LANDSTEINER sur les azoprotéines (COONS.A.H.1941) puis de ceux de REINER, EAGLE et MARRACK sur les possibilités de couplage de protéines anticorps avec différents composés diazotés, sans que cette union altère pour autant leurs spécificités immunologiques et biologiques (COONS.A.H.1941).Ceci permet à COONS, dès 1941, (COONS.A.H.194) de jeter les bases de l'immunofluorescence.(COONS.A.H.1950).

Le principe de la méthode directe de COONS consiste à appliquer sur la préparation préalablement fixée, contenant l'antigène à caractériser, quelques gouttes d'anticorps marqué. Nous exposerons plus loin les détails de la technique. Nous préférons souligner ici le principe général de la méthode d'immunofluorescence, laquelle comprend une méthode de fixation (Cryofixation des prélèvements) et une méthode d'obtention de coupes fines (Cryostat) à la congélation, puis une méthode de traitement des coupes et, enfin, une méthode d'éclairage d'excitation qui précèdent l'observation et la prise de vues en microscopie, lesquelles sont indissolublement liées et admettent chacune quelques variantes. Les méthodes d'absorption immunologiques ou de modification chimique sur coupes à congélation avant épreuve d'immunofluorescence seront exposées en dernier, mais sont liées aux précédentes et font

partie du principe général de la méthode dite d'immunofluorescence parce que garantes de sa spécificité.

C - Coupes à la congélation

Très largement utilisées pour l'étude des enzymes tissulaires, les coupes à la congélation ne se font bien que sur matériel congelé frais et qu'à l'aide d'un microtome-Cryostat qui permet la confection des coupes en atmosphère réfrigérée et autorise des coupes fines de 2 µ. Cependant les "objets" à couper ne doivent pas être trop volumineux pour ne pas offrir trop de résistance au microtome, pour que les coupes ne frisent pas et restent homogènes quand à leur épaisseur. De plus, lorsque l'on se propose d'effectuer des coupes sériées, il faut éviter les pertes. Il est donc nécessaire de couper au scalpel les objets trop volumineux de façon à obtenir des fractions orientables exploitables in toto.

Nous avons vu que le tissu, l'organe ou l'embryon prélevés sont immédiatement congelés en les plaçant sur les portoirs porte-objets du microtome. Cependant cette opération se fait par l'intermédiaire d'une couche de cire molle qui durcit avec eux et permet de les orienter convenablement mais aussi de les couper sans perte. Pour ce faire, on doit utiliser un système de refroidissement rapide par détente de CO_2 et on prend soin de laisser entre le plan métallique du porte-objet et l'objet une épaisseur de cire spéciale qui tient lieu de garde.

Matériel

1) Microtome-cryostat AMES

Ce microtome provient de la "DIVISION MILES-LABORATORIES" (Division MILES LABORATORIES, INC. ELKART. INDIANA 46514). Le microtome est équipé du "CO_2 quick freeze attachment" et d'une bouteille de CO_2 de "L'AIR LIQUIDE".

Ce matériel permet, en quelques secondes, de porter à - 50°C ou - 60°C un prélèvement d'organe. Nous l'avons utilisé en tant que technique de "fixation-sacrifice" d'embryon de poulet aux premiers stades de l'incubation, par congélation directe d'embryons vivants. Cependant cette température de "fixation" ne sera pas toujours celle qui conviendra pour effectuer les coupes. Des réglages de la température de coupe suivant la teneur en eau et en lipides des tissus sont conseillés par le constructeur. Des essais préalables permettent de fixer ces températures en fonction de l'âge des embryons. (teneur en eau et lipides).

2) Le milieu spécial de montage qui sert d'intermédiaire "Tissue-Tek O.C.T. Compound" (produit AMES) désignation commerciale : "Embedding medium for frozen tissue specimens".

Ce sont des glycols solubles dans l'eau et des résines. Ce milieu, liquide à la température du laboratoire mais très visqueux et transparent, devient dur et blanc à froid en passant par un état proche de celui de la paraffine molle qui autorise son moulage autour et sous l'objet. Il facilite l'orientation de l'objet.

2 - Mode opératoire

On place suffisamment d'O.C.T. Compound sur un porte-objet refroidi préalablement vers - 15°C pour former une matrice semi-liquide qui fait tampon entre le tissu et le métal et réalise une garde de coupe de quelques 3 ou 4 mm. d'épaisseur. On le verse à l'aide d'une pissette et on confectionne rapidement autour de l'objet et à son contact un lit qui le maintient dans la position choisie pour l'orientation des coupes. On place dans l'enceinte cryostatée jusqu'à six porte-objets ainsi chargés et on règle la température de coupe. Les lames pour microscopie sont soigneusement lavées et séchées - elles sont conservées hors de l'appareil à la tem-

pérature du local (15° C environ). Introduites une à une, au fur et à mesure de la coupe, elles sont automatiquement mises au contact des coupes effectuées et immédiatement sorties de l'enceinte pour décongélation de la coupe et séchage immédiats (10 à 15 secondes). Chaque lame est gravée (un rond autour de chaque coupe et références correspondant au numéro d'ordre quand il s'agit de coupes sériées) et porte jusqu'à trois coupes côte à côte. Les lames sont alors immergées dans l'acétone à l'aide d'une série de portoirs et placées à - 25°C. La fixation durera 24 heures. Les coupes sont toutes effectuées à 2 microns (commande manuelle), sans réfrigération préalable des lames de verre pour microscopie : les coupes y adhèrent parfaitement. Pour éviter que les coupes glissent sur les lames lorsque celles-ci sont sorties de l'enceinte cryostatée, où s'effectuent les coupes, on laisse les lames en position horizontale pour la décongélation des coupes et leur séchage. Nous plaçons simplement le doigt sous la coupe : la décongélation est immédiate et le séchage qui suit est bien visible (aspect sec de la coupe = disparition de l'aspect hyalin). On évite ainsi de plisser les coupes en ne les laissant pas décongeler et sécher en portoirs, c'est-à-dire en position inclinée sinon verticale. Cette précaution ne nous a pas semblé négligeable pour nos coupes qui, rappelons le, n'ont que 2 microns d'épaisseur. Cette épaisseur de coupe n'a pas été choisie pour éviter seulement de dépasser l'épaisseur des cellules embryonnaires des tissus lympho-épithéliaux, mais parce que cette finesse de coupe permet de réaliser des "tranches" au niveau cellulaire et, en particulier, des tranches correspondant au plus grand "diamètre" des cellules sur nombre d'entre elles. Cette condition est très importante à remplir si l'on veut différencier les cellules dont la fluorescence vient du cytoplasme (fluorescence intra-cellulaire) d'autres cellules dont la fluorescence est membranaire (extra-cellulaire) (Voir figure N° 12 - page 17b (2).

D - Traitement des coupes en vue de révéler l'antigène recherché : Technique dite d'immuno-fluorescence directe.

En effet : c'est l'antigène bêta-I-C globuline que nous recherchons à l'aide d'un immun-sérum anti-bêta-I-C globuline obtenu en immunisant des chèvres contre de la bêta-I-C globuline humaine. A la bêta-I-C très antigénique correspond un anti-sérum monovalent riche en anticorps anti-bêta-I-C que nous avons éprouvé en immunoélectrophorèse.

Matériel

a) Cet immun sérum provient de l'Institut KIRYAT WEIZMANN-REHOVOT-ISRAEL et est commercialisé par MILES-YEDA.LTD.

Nous avons vérifié sa spécificité : il est monovalent, c'est à dire qu'il ne correspond qu'à la fraction bêta-I-C du complément humain et non à des proportions non négligeables de bêta-I-A : en immunoélectrophorèse, il ne donne qu'un seul arc de précipitation (même lorsqu'il est utilisé pur) contre un sérum normal humain séparé par électrophorèse avec ou sans chauffage préalable à 56°C pendant 30 minutes. (Lundh. B. I965.)

Cet antisérum est obtenu sur la chèvre par injection de bêta-I-C purifiée (d'origine humaine). L'anti-sérum obtenu est purifié et conjugué de façon optimale avec l'isothiocyanate de fluorescéine. Puis, une purification sur DEAE cellulose selon le procédé de CEBRA et GOLDSTEIN (Cebra. J.J. I965.).Le réactif qui en résulte, virtuellement exempt d'immunofluorescence, non spécifique, est analysé pour déterminer le taux d'anticorps anti-bêta-I-C globuline marqués (fluorescéin-immunoglobulin ratio) aussi bien par immunoélectrophorèse que par immunofluorescence. Une fiche de contrôle est jointe à chaque échantillon fourni, en voici résumé l'essentiel:

- Fluorescein Conjugate of anti-human bêta-I-C Globulin prepared in Goat.
- Cheked and found monospecific.
- Preserved by 0,0I% Merthiolate.

En outre, cet anti-sérum est chauffé à 56°C pour le décomplémenter et est testé après purification en densité optique (O.D ratio : 280/495 = 4,4. Titre of serum Was 1,2 mg/ml) (Le revendeur pour la France est : EUROBIO, Boulevard Saint-Germain - PARIS).

Sur le catalogue des "MILES LABORATORIES", il est codé sous le n° 61-040 "FLUORESCEIN CONJUGATED igG fraction of antiserum to human beta-1-C globulin", ampoules de 2ml.

C'est ce produit que nous avons utilisé pour toutes nos expériences en immunofluorescence. Dilué extemporanément avec un tampon phosphates pour immunofluorescence dont voici la composition :

b) Tampon I.F.

soit : Eau physiologique pH 7,2 (0,01 M PO_4^-)

- Nacl pour analyses ..... 8,5 g
- $HNa_2 PO_4, 12 H_2O$ ..... 2,7 g
- $HNa PO_4, 2 H_2O$ ..... 0,4 g
- Eau distillée q.s.p. ..... 1 litre.

Le produit est utilisé au 1/500 et donne les mêmes résultats que l'anti-sérum anti Bêta-1-C/Bêta-1-A obtenu sur le lapin par injection de Bêta-1-C moins pure et commercialisé par les Laboratoires BEHRINGWERKE sous forme de lyophilisat à reprendre par 1 ml d'eau distillée et que nous avons également utilisé au 1/50.

c) Glycérine tamponnée pH 7,6 (0,1 M PO_4^-)

- $HNa_2 PO_4, 12 H_2O$ ..... 3,2 g
- $HNa PO_4, 2 H_2O$ ..... 0,15 g
- Eau distillée q.s.p. ..... 100 ml
- Glycérine bidistillée ..... 50 ml

Mode opératoire

Après 24 heures de fixation à l'acétone à - 25°C, on laisse sécher les lames quelques minutes, puis :

- on repère les coupes inscrites dans "un rond gravé"
- on verse quelques gouttes de tampon sur les coupes pour les réhydrater (3 minutes)
- on essuie les lames avec un tissu non pelucheux dessous et dessus, tout aurour des repères (ronds gravés)
- on applique le sérum conjugué avec une pipette Pasteur (1 pipette par dilution d'essai)
- on laisse agir 30 minutes à l'obscurité et en atmosphère humide
- on rince dans le tampon : 2 bacs successifs 5 minutes chacun. Dernier rinçage rapide à l'eau distillée.
- on essuie les lames dessus et dessous, le plus près possible des coupes.
- on monte à la glycérine transformée (glycérine tamponnée pH 7,6 (0,1 M PO_4^-)
- on lute aux quatre coins
- Observations et photographies au microscope immédiates.

E - OBSERVATION DES PREPARATIONS

Les observations des préparations ont été faites au microscope équipé d'une chambre petit format automatique toujours réglée de façon correcte, incorporée (photomicroscope II de ZEISS). Des éléments électriques et électroniques déterminent la durée d'exposition et exécutent automatiquement toutes les fonctions mécaniques de la chambre photographique. Le fait que cet instrument permette la prise rapide d'un grand

nombre de clichés successifs correctement exposés offre un grand avantage lorsqu'il s'agit de traiter un grand nombre de coupes sériées en immunofluorescence.

La source d'excitation est une lampe de forte puissance émettant dans l'ultraviolet : HBO 200 W/4 à vapeur de mercure haute pression. C'est la raie 365* qui est la plus efficace. C'est la méthode d'observation habituelle sur fond clair qui a été utilisée. Les objectifs sont du type NEOFLUAR (spéciaux pour fluorescence). Les objectifs utilisés sont :

objectif PLAN 10 * (365 millimicrons)
- PLAN 40
- PLAN 100

les oculaires sont du type K pl 10 X

Le coefficient de chambre 24 x 36 = 0,5

Calcul de l'échelle d'image sur diapositives EKTA.EH 160 ASA

1) avec objectif PLAN 10 =

0,5 x 10 x 10 = 50 (vues d'ensemble de la préparation

2) avec objectif PLAN 40 :

0,5 x 10 x 40 = 200 (pour détails)

3) avec objectif PLAN 100 (immersion)

0,5 x 10 x 100 = 500 (fort grossissement)

L'échelle d'image sur les reproductions au format 18 x 24 (voir chapitre : Résultats expérimentaux) devient :

X 325 (correspondant aux diapositives X 50)
X 1300 (correspondant aux diapositives X 200)
ou X 3250 (correspondant aux diapositives X 500)

F - TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE QUALITATIVE :

Recherche de la Bêta-1-C globuline du plasma et identification de la première formation in situ du facteur bêta-1-C.

1 - Sur des coupes d'intestin d'embryon de poulet

Une exploration topographique de l'intestin d'embryons de poulet au 20ème jour d'incubation, sur coupes à la congélation (sériées) a servi de point de départ à la recherche sur d'autres stades et sur d'autres tissus. Les zones les plus étudiées sont : l'anse duodénale, la région des coecas intestinaux et surtout le gros intestin.

Les coupes sont transversales par rapport à l'axe du tube intestinal et effectuées sur des portions congelées, numérotées, d'environ 4 mm. de long. Des coupes longitudinales intéressant la région du gros intestin et de la Bourse de Fabricius ont été effectuées après obtention de résultats positifs sur coupes transversales. L'exploration topographique systématique s'accomode mieux des coupes transversales que des coupes longitudinales, ces dernières restant théoriquement plus rapides à effectuer mais n'intéressant qu'un diamètre du tube intestinal : le diamètre moyen (sagittal médian). Les coupes transversales, en revanche, autorisent une exploration plus complète et une lecture des coupes plus aisée, bien que l'exploration par cette méthode soit plus longue.

2 - Sur des coupes intéressant tout l'embryon, avec contrôle d'identité histologique au moyen de colorations.

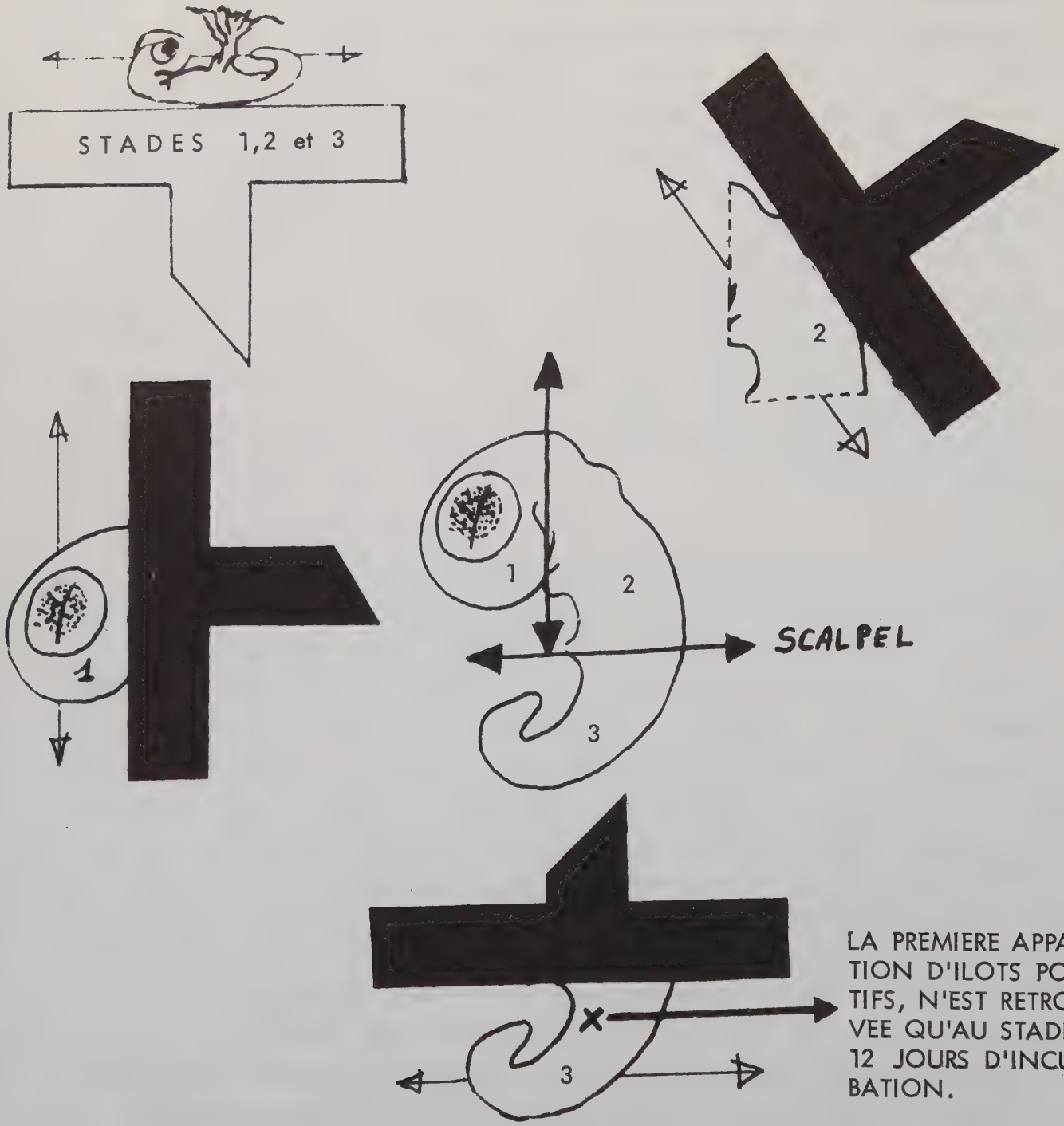
Suivant le stade d'incubation, on pourra congeler directement sur le support du microtome (porte-objet) l'embryon in toto. Ceci a été réalisé pour les stades 1, 2 et 3 jours d'incubation (schéma n° 7 en haut et à gauche).(Figure n° 7 p119)

Pour les embryons de 4 jours, jusqu'à l'éclosion, un partage préalable de l'embryon est nécessaire : il se fait après congélation de l'ensemble, au moyen d'un scalpel.

Le schéma n° 7 représente un partage d'embryon jeune (de 4 jours à 10 jours d'incubation maximum) en trois parties qu'on peut appeler "Tête", "tronc central" et "partie candale" . Au delà de 10 jours d'incubation, des sous-fractions de ces trois parties principales sont nécessaires. De plus, les plumes doivent être éliminées à partir du 11ème ou 12ème jour d'incubation, par un léger "massage" sous l'eau courante avant congélation de l'embryon : en effet, dès le 11ème jour d'incubation, les ébauches de plumes masquent la morphologie externe de l'embryon et peuvent entraver la manipulation lors de la confection des fractions au scalpel ou des coupes au microtome, en se détachant de la peau elle-même très fragile. La présence d'os n'entrave pas la coupe à la congélation : à - 30°C, la dureté de la préparation devient homogène.

L'exploration systématique au moyen de coupes seriées, effectuées à la congélation sur embryons ou fractions d'embryon devait permettre son exploration in toto à tous les stades de l'incubation (toutes les 24 heures), de manière à déterminer à quel stade de l'embryogénèse se situe la première formation de Bêta-1-C globuline, mais aussi à quelles cellules on la doit, à quel organe elle correspond. Aussi était-il prévu de colorer une coupe sur deux dès qu'une région s'avérerait positive en immunofluorescence, (se reporter au schéma n° 7) de façon à contrôler l'identité du site fluorescent qui, aux premiers stades de l'embryogénèse, aurait été difficile à identifier sur les seules observations en immunofluorescence. Nous verrons, lors de l'exposé des résultats expérimentaux que ce protocole s'est avéré moins utile puisque le premier stade positif correspond à une différenciation déjà marquée des organes que nous identifions dès le stade du prélèvement. Si nous le mentionnons ici au chapitre concernant les techniques, c'est qu'il nous a semblé que nous ne pourrions entreprendre cette recherche sur coupes intéressant tout l'embryon, sans prévoir la coloration parallèle de coupes dont nous ne pouvions, en toute logique, exclure l'éventualité d'une réponse positive aux tout premiers stades de l'incubation.

FIG N°7



IMMUNOFLUORESCENCE EXPLORATION SYSTEMATIQUE DE L'EMBRYON DE POULET INTOTO. PARTAGE DE L'EMBRYON CONGELE PREALABLEMENT A LA CONFECTION DES COUPES SERIEES A LA CONGELATION.

3 - Sur des coupes de la Bourse de Fabricius

Dans l'étude systématique qui précède (paragraphe 2 précédent), nous avons traité en immunofluorescence des coupes passant par l'ébauche de la Bourse de Fabricius, aux stades antérieurs au 12ème jour d'incubation.

La Bourse de Fabricius n'est bien individualisée qu'aux 10 ou 11ème jours d'incubation ou elle peut être prélevée seule. Des coupes selon l'axe sagittal médian et dans une direction perpendiculaire (coupes transversales), permettent son exploration topographique. A l'aide de coupes sériées à la congélation, nous avons ainsi exploré en immunofluorescence, depuis le 12ème jour, jusqu'à l'écolosion, la Bourse de Fabricius dans son ensemble.

4 - Sur des coupes du Thymus

Dans l'étude systématique du paragraphe 2 ci-dessus, nous avons coupé la région du cou où se situent les ébauches des lobes thy miques. Nous avons également prélevé les lobes thymiques seuls et les avons explorés en totalité (se reporter au chapitre concernant les prélèvements : chapitre II : Préparation d'organes chez l'embryon et à maturité).

Nous avons effectué les coupes à la congélation sur chaque lobe thymique congelé entier. Ces coupes sont orientées perpendiculairement au plan sagittal médian, ce qui ne présente pas de difficultés particulières vu l'orientation in vivo de ces lobes allongés selon le névraxe et disposés en deux chapelets parallèles selon cette direction. Nous avons exploré les stades de l'incubation depuis le 10ème jour jusqu'à l'éclosion.

./...

G - TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE QUANTITATIVE :

Mesure de la densité de population cellulaire Bêta-1-C formatrice.

En fixant les conditions d'observation au microscope, on observe quelle que soit la coupe, un champ constant. On a vu que toutes les coupes sont effectuées au microtome à congélation (Cryostat) à 2 microns. Cette épaisseur de coupe est inférieure à l'épaisseur des cellules rencontrées comme on peut s'en assurer en modifiant la mise au point. Lorsqu'on explore "en profondeur" la coupe, la translation des images est minime et il n'y a pas de substitutions morphologiques traduisant une surépaisseur. De plus, il est presque toujours possible de mesurer au micromètre objectif cette épaisseur et de la comparer aux sections maximum des cellules, y compris les éléments de la population cellulaire dont nous cherchons à apprécier la densité : il suffit de rechercher au bord de la coupe d'un lobule thymique ou d'une Bourse de Fabricius coupés in toto (parallèlement au plan sagittal médian pour la bourse ou perpendiculairement à ce plan pour les lobules thymiques) le"ruban" correspondant à une aponévrose, lequel en certains endroits est détaché et mis à plat (l'analogie avec la "peau" d'une tranche de saucisson peut fixer les idées).

Dans ces conditions, nous avions, lors de la recherche (qualitative) de la première formation in situ de la fraction Bêta-1-C du complément chez l'embryon de poulet, déterminé pour deux organes le stade d'incubation à partir duquel des coupes montraient au faible grossissement des îlots ou essaims de "points" fluorescents à l'échelle cellulaire. Au fort grossissement, Ces points purent être identifiés comme correspondant à des tranches cellulaires plus ou moins larges, d'éléments dont la plupart sont en division (mitoses) - Les plans d'ensemble sur une coupe d'organe intéressant l'ensemble de la Bourse de Fabricius ou d'un lobule thymique, montraient bien la formation en essaims pous ou moins serrés, tantôt dans la région médullaire (Thymus), tantôt dans la région corticale (Bourse de Fabricius)

de ces organes lympho-épithéliaux. Mais, surtout, le nombre de ces essaims ou de ces tranches de cellule fluorescentes augmentait en fonction de l'âge des embryons ou des poussins ou poulets étudiés.

Nous avons alors entrepris de mesurer cette variation et de présenter les résultats sous forme de graphique représentant l'évolution de la densité de population cellulaire Bêta-1-C positive en fonction de l'âge,depuis son apparition, jusqu'à la maturité sexuelle où ces organes commencent leur involution (très rapide pour la bourse, plus lente pour le Thymus).

- Fixation des conditions d'observation au microscope
  Choix d'une unité de surface (Figures N° 8 et 9 p. 123-124)

  Objectif PLAN 10
  Oculaire k p 1 10 X
  Coefficient de chambre 24 X 36 = 0,5
  Dans ces conditions, le cadreur rectangulaire de visée Reflex couvre une surface constante et permet d'observer dans ses limites un champ constant quelle que soit sa valeur absolue, qui d'ailleurs est facile à calculer :

  0,66 mm X 0,45 mm = 0,297 mm^2
  soit une surface de 0,3 mm^2 environ, constante.

- Mode opératoire commun à la Bourse de Fabricius et au Thymus (pages 123 et 124 : figures N° 8 et 9).

On explore entièrement la coupe en cadrant à chaque site positif rencontré (essaim de cellules fluorescentes). L'expérience montre que notre unité de surface définie par les conditions d'observation est le plus souvent suffisante pour cerner ces îlots séparés les uns des autres par des distances légèrement supérieures aux dimensions maximum des îlots positifs. Ceci correspond aux séparations de structure entre les nombreuses médullaires par les cortex justaposés, chaque lobe comportant

FIG N° 8

X 325

THYM
POULt
3M

THYMUS 1

90 jours

14ième
lobe

11ième
coupe

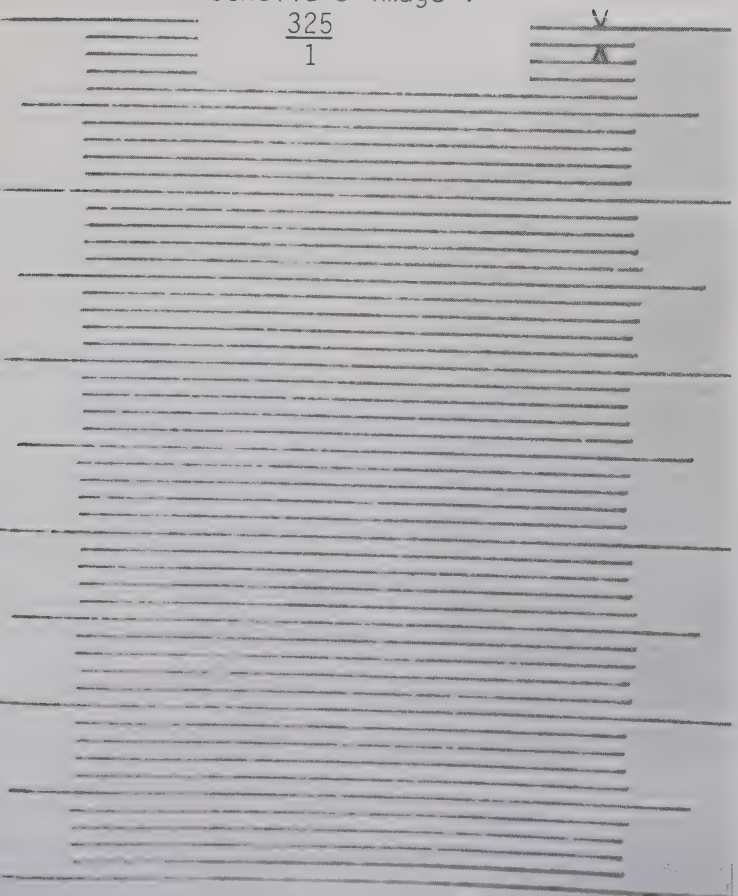
41ème
champ

T1.90.14.11.41

SUR CET EXEMPLE

$$D = \frac{N}{S} = \frac{90}{0,3} = 300$$

micromètre
objectif 1 mm en 100 1/100 mm
échelle s'image :
$\frac{325}{1}$



ON CADRERA SUR UN GRAND NOMBRE DE CHAMPS FLUOts POUR ETABLIR UNE MOYENNE Dm, correspondant à une seule coupe, puis après examen d'un grand nbre de Coupes pour un seul stade on a

D Moy

$$Dm = \frac{\text{Somme des D de chaque site}}{\text{Nombre de sites fluorescents examinés sur une coupe à 1 stade donné.}}$$

$$DMoy = \frac{\text{Somme des Dm}}{\text{Nombre de coupes examinées à ce stade.}}$$

FIG N°9

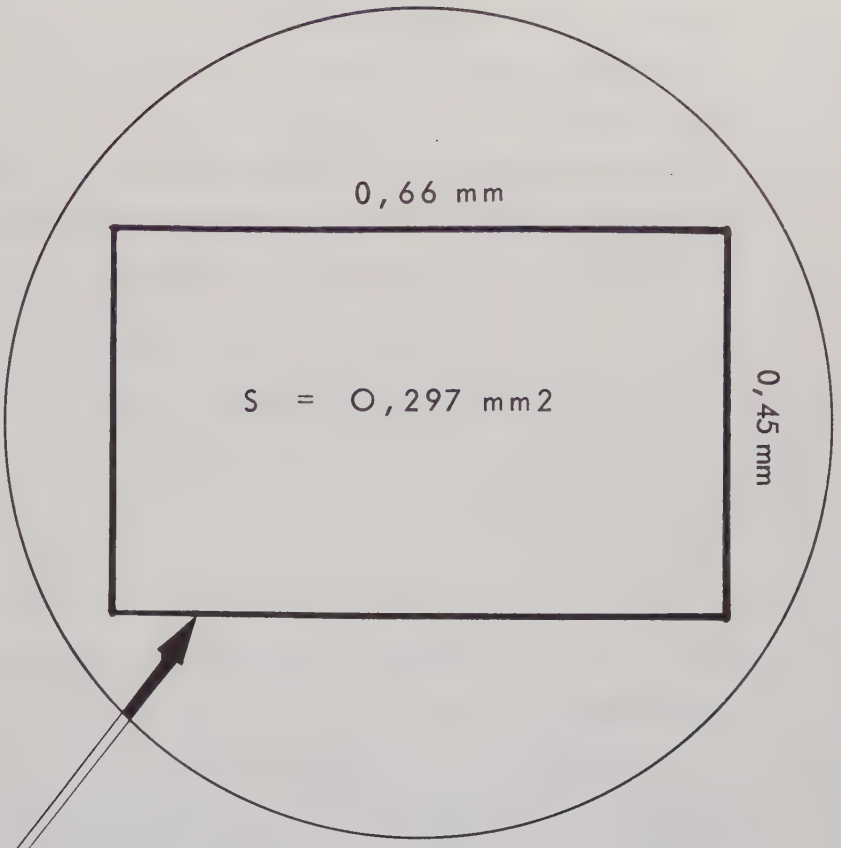
$$D = \frac{\text{N}}{\text{nombre de cellules FLUORESCENTES PAR UNITE DE SURFACES}}$$

OBSERVATION AU MICROSCOPE d'un champ constant si conditions

OBJECTIF PLAN 10
OCULAIRE KPL 10 X COEFF. DE CHAMBRE 24 X 36 = 0,5
FIXEES.

Echelle d'image :
10 X 10 0,5 50 et sur tirages
18 X 24, 50 X 6,5 325

DANS CES CONDITIONS LE CADREUR DE VISEE REFLEX COUVRE
env. S = 0,3 mm2



$$D = \frac{N}{S}$$

RESULTATS EXPERIMENTAUX

de nombreux follicules serrés les uns contre les autres. Ainsi, dans le thymus la coupe d'un lobe entier montre des médullaires espacées où se situent ces essaims ou îlots cellulaires positifs. La coupe d'une bourse de Fabricius montre des lobulations dans lesquelles de nombreux follicules se pressent. Mais, ici, les essaims ou îlots sont rares, les cellules positives se trouvent davantage dans les médullaires que dans le cortex, assez isolées

Lorsque l'on rencontre, dans le thymus, des essaims positifs très denses et mal séparés, ou lorsque dans la bourse de Fabricius on rencontre des tranches cellulaires positives éparses, on procède à un quadrillage systématique de la coupe pour en relever la densité (le nombre de tranches cellulaires positives par unité de surface).

Pour chaque coupe effectuée (coupes seriées intéressant tout l'organe) on a cadré par balayage méthodique du champ offert plusieurs sites. On a compté les tranches de cellules fluorescentes à l'intérieur de notre cadre (surface unité) et on a noté la densité d pour chaque cadrage:

$$d = \frac{n}{s}$$ (Fig. n° 8 et 9 p. 123 - 124

d = densité de population cellulaire Bêta-1-C positive à l'intérieur du cadreur de visée reflex à un grossissement déterminé.

n = nombre de tranches cellulaires Bêta-1-C positives.

s = unité de surface : le cadreur de visée pour images 24 x 36 couvre dans ces conditions 0,3 mm^2 environ, donc s = 0,3 .

1 - Sur des coupes de Thymus

Voir le schéma n°9 et la reproduction photographique en couleur d'un essaim positif type (x 325) sur thymus de poulet de 3 mois, qui sert d'exemple et illustre la technique :

il y a environ 90 cellules positives qui sont intéressées par la coupe sur ce cadrage là :

$$d = \frac{n}{s} = \frac{90}{0,3} = 300$$ (figure N° 8 - page 123)

Sur la même coupe, on a effectué 4I cadrages semblables positifs, autrement dit nous ne pouvions pas en trouver davantage. Cette coupe type d'un lobe thymique est positive dans la région centrale.Le reste de la coupe est optiquement vide en immunofluorescence directe par les anticorps anti-bêta-I-C globuline. Seule la fluorescence de fond (très faible par rapport à l'intensité de la fluorescence spécifique) permet son repérage. Ceci explique qu'on trouve d'abord en "entamant" les lobes thymiques et en déterminant leur exploitation au microtome-cryostat des coupes qui s'avèrent négatives en immunofluorescence directe : D'une façon générale les lobes thymiques ne sont positifs que dans leur partie centrale.

Il existe 9 à IO lobes (parfois 7 ou 8) plus ou moins volumineux par chapelet (unilatéral) thymique donc de IO à 20 lobes pour un thymus au maximum. Nous avons donc obtenu un très grand nombre de valeurs de densité d. La moyenne dm de ces valeurs pour une seule coupe, s'obtient en additionnant les d mesurées et en divisant la somme par le nombre de champs cadrés. A chaque champ correspond une valeur de d.

Dans l'exemple précédent on a trouvé 4I valeurs de d. La valeur moyenne dm fut trouvée égale à 320 et correspond à une seule coupe effectuée (parmi les coupes exploitables, de 2 microns d'épaisseur selon le plan perpendiculaire à la direction du chapelet thymique) dans la région centrale d'un seul lobe thymique exploité in toto (2 coupes par lobes soit 34 coupes par Thymus).

Le thymus au complet (les deux chapelets thymiques totalisaient I7 lobes) pesait frais 5 grammes.

Le lobe en question, l'un des plus volumineux (partie cervicale du chapelet) pesait 0,38 gr et mesurait 1,6 cm selon l'axe du chapelet thymique et 0,7 cm transversalement. On a débité des coupes négatives jusque dans la région moyenne où sur 2 coupes positives nous avons entrepris ce calcul. Et ce sur les 17 lobes où nous avons choisi d'effectuer ce comptage pour 2 coupes centrales jugées particulièrement positives.

d représente donc la densité de population cellulaire bêta-1-C positive pour un cadrage. dm représente la moyenne des valeurs de d pour une seule coupe. dm 2 représente la moyenne des dm d'un seul lobe (des 2 coupes) DT représente la moyenne des dm 2 (sur environ 17 lobes) soit pour un thymus entier. DT représente donc un seul stade et un seul animal. Dans notre exemple type on écrira DT3M (3 mois). Et pour un embryon de 17 jours d'incubation : DT17J.

L'étude a porté sur deux animaux par stade exploré.
On a exploré de 24 heures en 24 heures les stades d'incubation du développement embryonnaire depuis le stade 16 (16ème jour d'incubation compris) à l'éclosion (21ème jour ou 22ème jour) (les coupes ne sont positives qu'à partir du 17ème jour d'incubation). Puis de 15 jours en 15 jours depuis l'éclosion jusqu'à 4 mois révolus. Ce qui représente 6 stades sur embryon et 8 stades sur poussins ou poulets. (Le tableau N° 4 résume nos calculs - voir au chapitre : résultats expérimentaux, page 211). Soit : 6+8 = 14. (14 stades soit 28 animaux dont 12 embryons). A raison de 34 coupes (environ) par Thymus soit : 34 X 28 = 952 coupes examinées.
(14 stades soit 14 points pour construire la Courbe Thymus).
Voir nos résultats expérimentaux : Tableaux 1, 2, 3 et 4, résumant nos calculs des 14 coordonnées d'expérimentation) et le graphique fig. N° 37 - page 212 ainsi que la fig. N° 10 - page 134.

- 2 - Sur des coupes de la bourse de Fabricius

Lors de notre étude qualitative (immunofluorescence) c'est la bourse de Fabricius qui s'avera être l'organe où se situe, chez l'embryon de poulet, la toute première formation in situ de la globuline Beta-1-C (le plus important des facteurs du système complément).

Ce n'est que le jour suivant que quelques cellules "Beta-1-C positives" furent trouvées près de la bourse de Fabricius dans l'intestin terminal (rectum ou gros intestin).

Mais ce n'est que cinq jours plus tard, et seulement au niveau du thymus de l'embryon, que nous avons pu mettre en évidence une formation de Beta-1-C d'emblée plus importante (première formation de Beta-1-C au niveau du thymus).

Lors du prélèvement des lobes thymiques, nous avons parallèlement bursectomisé les animaux exploités, ce qui nous a fourni autant de bourses de Fabricius que de thymus, du moins dans un premier temps, car il restait à prélever la bourse de Fabricius sur les cinq stades (cinq jours d'incubations) précédant le stade d'apparition de la Beta-1-C dans le thymus. Ainsi l'étude parallèle concernant la bourse de Fabricius a porté sur :

14 + 5 = 19 stades

dont 8 stades sur poussins ou poulets, et 11 stades sur embryons (y compris le jour de l'éclosion et le 11ème jour d'incubation).

Nous avons vu au chapitre : " Prélèvements d'organes

.../...

chez l'adulte. (A broyer ou à congeler pour coupes) - pages 58 et 59 puis 61 et 62, la technique exposée est applicable au stade "90 jours" (poulets ou poulettes de 3 mois).

Le prélèvement des lobes thymiques et de la bourse de Fabricius à congeler pour coupes ne diffère pas beaucoup lorsqu'on opère sur des stades du développement après l'éclosion, car, le thymus comme la bourse de Fabricius, aux stades où nous commençons à les prélever chez l'embryon, pour notre étude quantitative en immunofluorescence, ont acquis leur morphologie "adulte" : le thymus au 16ème jour d'incubation est multilobé, les deux chapelets thymiques sont présents ; la bourse de Fabricius est bien individualisée. Il ne s'agit plus des ébauches du 10ème ou 12ème jour (apparition du thymus chez le poulet). (DMITRIEVA H.W. 1939 ; cité par ARVY L. 1963 - page 668) (ARVY L. 1963 - page 684). Il ne s'agit plus de l'ébauche du 6ème jour (apparition de la bourse de Fabricius) (JOLLY J. 1915 - page 397). Facilement repérés, les lobes thymiques comme la bourse de Fabricius sont, chez l'embryon dès le 12ème jour d'incubation, plus faciles à prélever : les tissus voisins très fragiles sont aisément écartés. Seules difficultés : la fragilité de ces deux organes et leurs petites tailles. Il est nécessaire d'opérer sous la loupe binoculaire.

En revanche, la confection des coupes à la congélation est plus aisée chez l'embryon. L'organe adulte fournissant des coupes de grandes dimensions qui, effectuées à 2 µ peuvent se plisser.

L'étude quantitative en immunofluorescence, au niveau de la bourse de Fabricius a donc porté sur 19 stades (contre 14 seulement pour le thymus). Mais, alors que chaque thymus comporte 18 lobes à explorer, la bourse de Fabricius est toujours coupée perpendiculairement à l'axe sagittal médian, comme le serait un seul lobe thymique. 2 coupes sériées, effectuées dans la région équatoriale de l'organe sphéroïde, sont traitées par le sérum conjugué. Cependant, chaque coupe étant environ 10 fois plus étendue qu'une coupe de lobe thymique de même âge, le quadrillage systématique de la coupe jugée la plus positive parmi les 2 coupes de bourse examinées, donne dix fois plus de valeurs de d :

$$d = \frac{n}{S}$$

n = nombre de tranches cellulaires fluorescentes par unité de surface S

S = 0,3 mm^2 (surface couverte dans des conditions d'observation fixées (voir pages 123 et 124 les figures 8 et 9) par le cadreur de visée reflex).

Notons que la densité de population cellulaire Bêta-1-C positive, au niveau de la bourse de Fabricius, étant beaucoup plus faible, les comptages ne sont pas beaucoup plus longs (3 X).

Par exemple : sur l'une des deux bourses de Fabricius exploitées (2 animaux par stade) nous avons dû, au stade 4 mois sur les 2 coupes effectuées dans la région moyenne de l'organe (plan normal à l'axe sagittal) où le diamètre est maximum 18,5m/m environ), faire 366 comptages en moyenne par coupe (366 comptages parce que 366 champs de 0,3 mm^2 trouvés positifs: une ou plusieurs cellules positives par champs n $\geqslant$ 1). Nous avons donc obtenu

en moyenne 366 valeurs de d par coupe ($d \geqslant 3{,}33$).

La moyenne du dm pour une coupe s'obtient en faisant la somme des d calculées, (divisée par 366 sur notre exemple type, figure N° 10 - page 134) divisée par le nombre de champs de 0,3 mm^2 trouvés positifs.

La moyenne dm^2 pour une bourse de Fabricius s'obtient en faisant la somme des dm calculées, à diviser par 2 (nombre de coupes effectuées par bourse de Fabricius exploitée). Cette dernière moyenne vaut pour une seule bourse (un seul animal). Deux animaux par stade fournissent donc deux valeurs de dm2. ($dm\ 2_1$ et $dm\ 2_2$), les homologues des valeurs DT1 et DT_2 (thymus). Nous les avons symbolisés par DF_1 et DF_2 sur le tableau récapitulatif N° 4 - page 211 : (voir nos résultats expérimentaux).

Pour un stade, la moyenne DF s'obtient en faisant :

$$DF = \frac{DF_1 + DF_2}{2}$$

Si au stade du développement étudié (le plus avancé), c'est-à-dire à 4 mois révolus (stade où la bourse de Fabricius a atteint son plein développement avec la maturité sexuelle), nous sommes obligés de faire en moyenne 366 comptages (366 champs de 0,3 mm^2 par coupe et ce sur 2 coupes), il n'en va plus de même avec les 18 autres stades à étudier. En effet : après ARVY L. (1963 - page 668), nous avons pu constater que "entre les âges de deux à quatre mois, le poids du corps triple, alors que le poids de la bourse devient huit fois plus important (de 0,50 g à 4 g).

.../...

: Au lieu des 366 champs positifs trouvés au stade 4 mois, nous n'avons pu dénombrer que 46 champs positifs au stade 2 mois; et 32 à 1 mois. A l'éclosion : 26 valeurs de d par coupe seulement. Chez l'embryon, à chaque stade de l'incubation en remontant dans l'âge, le nombre des champs de 0,3 mm^2 diminue pour devenir nul à 11 jours d'incubation.(à 12 jours d'incubation on dénombre en moyenne sur les 2 coupes effectuées, 4 champs positifs seulement).

Donc sur les 19 stades explorés pour mesurer la densité de population cellulaire Beta-1-C positive en immunofluorescence directe au niveau de la bourse de Fabricius, on voit que seuls les 3 derniers stades du développement ont été longs à exploiter.

Nombre de bourses de Fabricius exploitées :
(sur 19 stades, avec 2 animaux par stade étudié).

19 x 2 = 38 bourses

Nombre de coupes à la congélation effectuées :
(2 coupes par bourse)

2 x 38 = 76 coupes

(Voir tableau page suivante).

../...

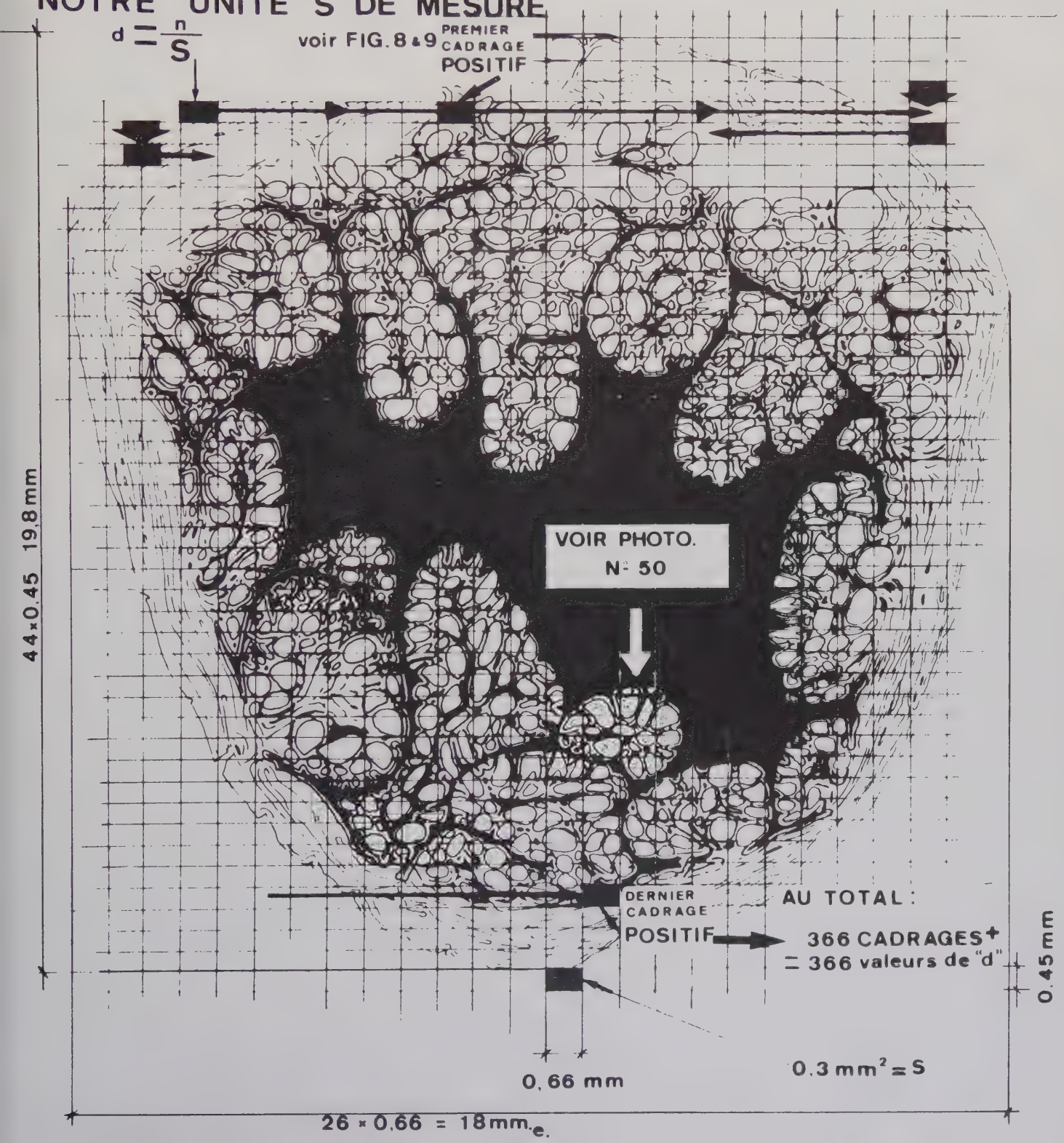
Nombre total de valeurs de d calculées par stade étudié (Nombre moyen de champs positifs existants par coupe (vd) multiplié par 2 et multiplié par 2 :

Stade (Jours)	Vd	(2 coupes) Vd x 2	(2 animaux) Vd x 2 x 2
120	366	732	1 464
105	307	614	1 228
90	240	480	960
75	135	270	540
60	46	92	184
45	41	82	164
30	32	64	128
15	29	58	116
Eclosion	26	52	104
20ème Jour d'incubation	23	46	92
19 "	22	44	88
18 "	21	42	84
17 "	19	38	76
16 "	18	36	72
15 "	15	30	60
14 "	12	24	48
13 "	6	12	24
12 "	4	8	16
11 "	0	0	0
Nombre total de valeurs de d calculées.....			5 448

FIG. n° 10

MESURE DE LA DENSITE "d" DE POPULATION CELLULAIRE BETA 1 C POSITIVE EN IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE ILLUSTRATION DE LA METHODE DE COMPTAGE: AU NIVEAU D'UNE COUPE (BOURSE DE FABRICIUS POULET DE 4 MOIS)

EXPLORATION SYSTEMATIQUE DE COUPES SERIEES AU MOYEN DU CADREUR DE VISEE 24×36 COUVRANT 0,3 mm², NOTRE UNITE S DE MESURE



VII - METHODES d'ABSORPTION IMMUNOLOGIQUE OU DE MODIFICATION CHIMIQUE SUR COUPES A CONGELATION AVANT EPREUVE d'IMMUNOFLUORESCENCE

A - avec hydrazine

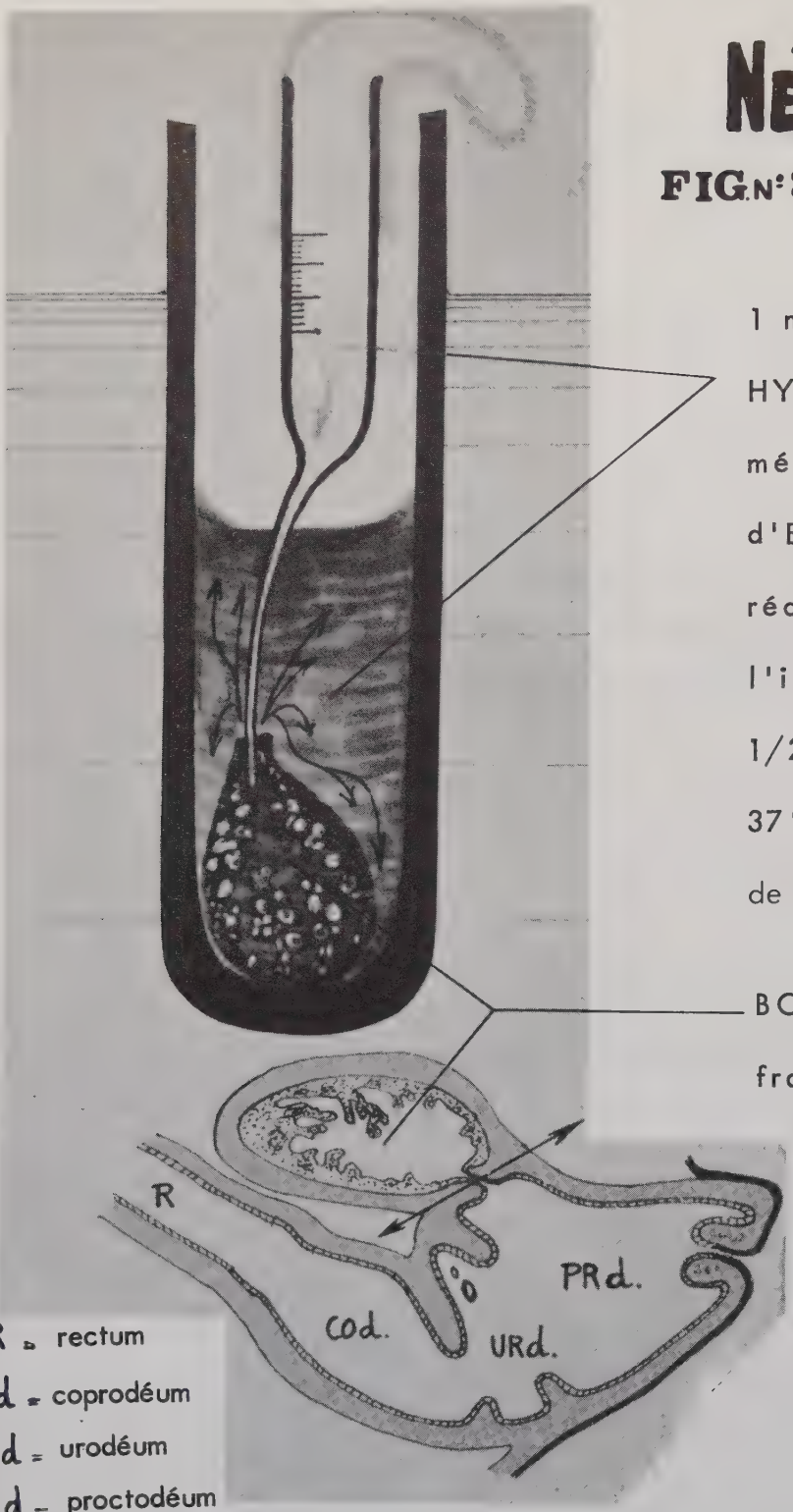
B - avec serum anti-thymus

C - avec serum anti-Bourse de Fabricius.

D - avec serum anti-IG poule

NÉGATIVATION

FIG.N°35



R = rectum
COd = coprodéum
URd = urodéum
PRd = proctodéum

1 ml solution d'
HYDRAZINE au 1/20
mélangé à 9 ml
d'EAU tamponnée
réalise une dilution de
l'inhibiteur qui agira au
1/200ème 30 minutes à
37°c sur "jeune"bourse
de Fabricius

BOURSE DE FABRICIUS
fraîchement prélevée avec
SECTION du
pédicule d'attache
dorsal de la bour-
se sur l'intestin
postérieur
la cavité de la bourse
est alors accessible :
on y injectera la solu-
tion.

Le schéma ci-dessus représente la structure du cloaque d'un oiseau adulte, nous avons représenté volontairement la bourse de Fabricius à un stade plus jeune de son développement : plus volumineuse, elle n'a pas encore involué et reste fonctionnelle en tant qu'organe lymphoïde jusqu'à la maturité sexuelle de l'oiseau. (début du 5ème mois chez le poulet).

Après incubation les bourses de Fabricius sont immédiatement congelées à -30°c. On pratiquera des coupes de 2 μ à la congélation (cryostat) Sur bourses traitées et sur témoins non traités à l'hydrazine mais ayant subi la même incubation . Seules les coupes traitées restent négatives.

A - avec hydrazine

Avant la confection des coupes, et directement sur l'organe frais prélevé (lobe thymique ou bourse de Fabricius), on fait agir à 37° C et pendant 30 minutes, une solution d'hydrazine chlorydrate en milieu tamponné.

La figure N° 35 représente le mode opératoire adopté pour le traitement de bourse de Fabricius fraîchement prélevée, par section de son pédicule d'attache à la partie dorsale de l'intestin terminal (Proctodéum), et qui fait communiquer la cavité de la bourse avec la lumière intestinale.

On introduit dans un tube à essais la bourse de Fabricius de façon à ce que son col soit accessible. On verse 9 ml de tampon Mayer Lévine au 1/5ème. On porte le tube au bain marie à 37° C puis, immédiatement, on introduit l'extrémité rodée d'une pipette Pasteur effilée (montée en compte-goutte) dans la cavité de l'organe par l'intermédiaire du pédicule d'attache. Le contenu du compte-goutte (1 ml de solution d'hydrazine au 1/20ème) est expulsé dans l'organe et se répand en retour dans le tampon, réalisant ainsi une dilution d'hydrazine au 1/200ème qui agira pendant 30 minutes à 37° C.

Après quelques ponctions (expulsions, au moyen du compte-goutte en place, on a chassé l'air résiduel de la cavité de la bourse, et homogénéisé le mélange.

(Nous avons traité en détail la technique de prélèvement de bourse

de Fabricius et de thymus au paragraphe II - PREPARATIONS D'ORGANES CHEZ L'EMBRYON ET AU DELA DE L'ECLOSION ... 3 - Prélèvement d'organes chez l'adulte - à broyer ou à congeler pour coupes -).

La technique qui y est décrite, vaut pour le prélèvement d'organes à traiter par l'hydrazine avant congélation (c'est-à-dire fraîchement prélevés).

On préparera de même des organes témoins qu'on fera incuber en tampon Mayer-Lévine au 1/5 ; 30 minutes à 37° C.- sans hydrazine. Ensuite, les organes seront lavés au tampon phosphate pour immunofluorescence, et congelés pour coupes à la congélation à pratiquer dans la région centrale (plan normal à l'axe sagittal. Nous verrons dans la deuxième partie : RESULTATS EXPERIMENTAUX, la différence observée entre témoins et traités, c'est-à-dire entre les coupes provenant d'organes incubés avec hydrazine, et les coupes provenant d'organes témoins, les unes comme les autres ayant été traitées par l'immun-sérum monovalent anti-Bêta-1-C globuline, conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (immuno-fluorescence directe de COONS).

Cet essai de négativation spécifique de la fluorescence observée sur témoins, a pour but de s'assurer de la spécifité de la fluorescence des cellules positives dans le thymus et dans la bourse de Fabricius.

D'autres essais de négativation de la fluorescence

spécifique doivent corroborer nos résultats.

B - avec sérum anti-thymus

Notre immun-sérum anti-thymus, obtenu chez le lapin par immunisation contre une suspension de fractions subcellulaires de pulpe thymique, a été utilisé sur coupes à la congélation avant traitement de celles-ci par le sérum conjugué, monovalent, anti-Bêta-1-C globuline, et ce, aussi bien sur coupes de thymus que sur coupes de bourse de Fabricius.

On a effectué deux coupes sériées, de place en place, dans la région centrale de lobes thymiques ou de bourses de Fabricius à différents stades du développement.

Chaque couple de coupes fournit un témoin et une coupe à traiter.

C - avec sérum anti-bourse de Fabricius

Notre immun-sérum anti-bourse de Fabricius, obtenu chez le lapin, par immunisation contre une suspension de fractions subcellulaires de médullaires fabriciennes, a été utilisé sur coupes à la congélation, avant traitement de celles-ci par le sérum conjugué, monovalent, anti-Bêta-1-C globuline. Et ce, aussi bien sur coupes de thymus que sur coupes de bourse de Fabricius.

On a effectué 2 coupes sériées, de place en place, dans la région centrale de bourses de Fabricius ou de lobes thymiques, à différents stades du développement.

Chaque couple fournit un témoin et une coupe à traiter.

D - avec sérum anti-IG poule

L'immun-sérum de lapin anti-IG de poule (produit Ser-Pasteur) a été obtenu par immunisation de lapins contre une fraction purifiée des seules immunoglobulines du sérum de poule.

Nous avons vérifié sa spécificité par la technique d'immunoélectrophorèse.

Nous l'avons utilisé sur coupes à la congélation, avant traitement de celles-ci par le sérum conjugué, monovalent, anti-Bêta-1-C globuline. Et ce, aussi bien sur coupes du thymus, que sur coupes de la bourse de Fabricius ou de l'intestin, chez l'embryon et jusqu'au delà de l'éclosion.

On a effectué 2 coupes sériées de place en place dans la région centrale de lobes thymiques ou de bourses de Fabricius, principaux organes lymphoïdes du poulet, et au niveau des formations lymphoïdes de l'intestin, où du tissu lympho-épithélial se développe, à différents stades du développement.

Chaque couple de coupes fournit un témoin et une coupe à traiter.

Cette dernière tentative de négativation de la fluorescence observée sur coupes de cellules, a pour objet de lever le doute qui pourrait subsister au sujet de la nature de l'antigène révélé in situ (qu'on soupçonne l'immun-sérum anti-Bêta-1-C conjugué de ne pas être monovalent, ou qu'on admette la possibilité de parenté antigénique entre Bêta-1-C humaine et IG de poule...).

- Mode opératoire commun aux trois immun-sérum de lapin utilisés (anti-thymus; anti bourse de Fabricius; anti-I.G. poule

Après 24 heures de fixation à -25°C, on laisse sécher les coupes quelques minutes, puis:

- on repère les coupes inscrites dans un "rond gravé"
- on verse quelques gouttes de tampon I.F. sur les coupes pour réhydrater (3 minutes)
- on essuie les lames avec un tissu non pelucheux dessous et dessus, tout autour des repères (ronds gravés)

On applique alors le sérum non conjugué (soit l'un des trois immuns sérums ci-dessus), avec une pipette Pasteur (une pipette par sérum, et une pipette par dilution d'essai).

on laisse agir 30 minutes à l'obscurité et en atmosphère humide.

- on rince abondamment dans le tampon I.F. :

  2 bacs successifs, 5 minutes chacun.

  Dernier rinçage rapide à l'eau destillée.
- on essuie les lames dessus et dessous, le plus près possible des coupes.

On applique alors le sérum conjugué à l' isothiocyanate de fluoresceïne : l'immun-sérum de chèvre anti-Beta-1-C globuline. (1 pipette Pasteur par dilution d'essai).

- on laisse agir de nouveau 30 minutes à l'obscurité et en atmosphère humide.
- on rince dans le tampon I.F. : 2 bacs successifs, 5 minutes chacun. Dernier rinçage rapide à l'eau destillée.

- on essuie les lames dessus et dessous, le plus prés possible des coupes .
- on monte à la glycérine transformée (glycérine tamponnée pH = 7,6 (0,1 M PO_4^-).
- on lute aux quatre coins.
- Observations et photographies au microscope immédiates

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX

I - SENSIBILITE DE L'ULTRAMICROMETHODE DE DOSAGE DU COMPLEMENT :

A/ sur sérums de cobaye : La sensibilité des microdosages du complément total (à partir d'une seule goutte de sang) est explicitée dans les 4 graphiques suivants :

	Temps tH50
graphique Page 144.....	15 mn 30 sec
graphique Page 145.....	15 mn 45 sec
graphique Page 146.....	15 mn 45 sec
graphique Page 147.....	15 mn 30 sec

Les réactions d'hémolyse débutent avec une concentration en complément total égale à 1/1530.

B/ sur sérums de poulets : Avec des sérums de poulet, nous obtenons les résultats suivants :

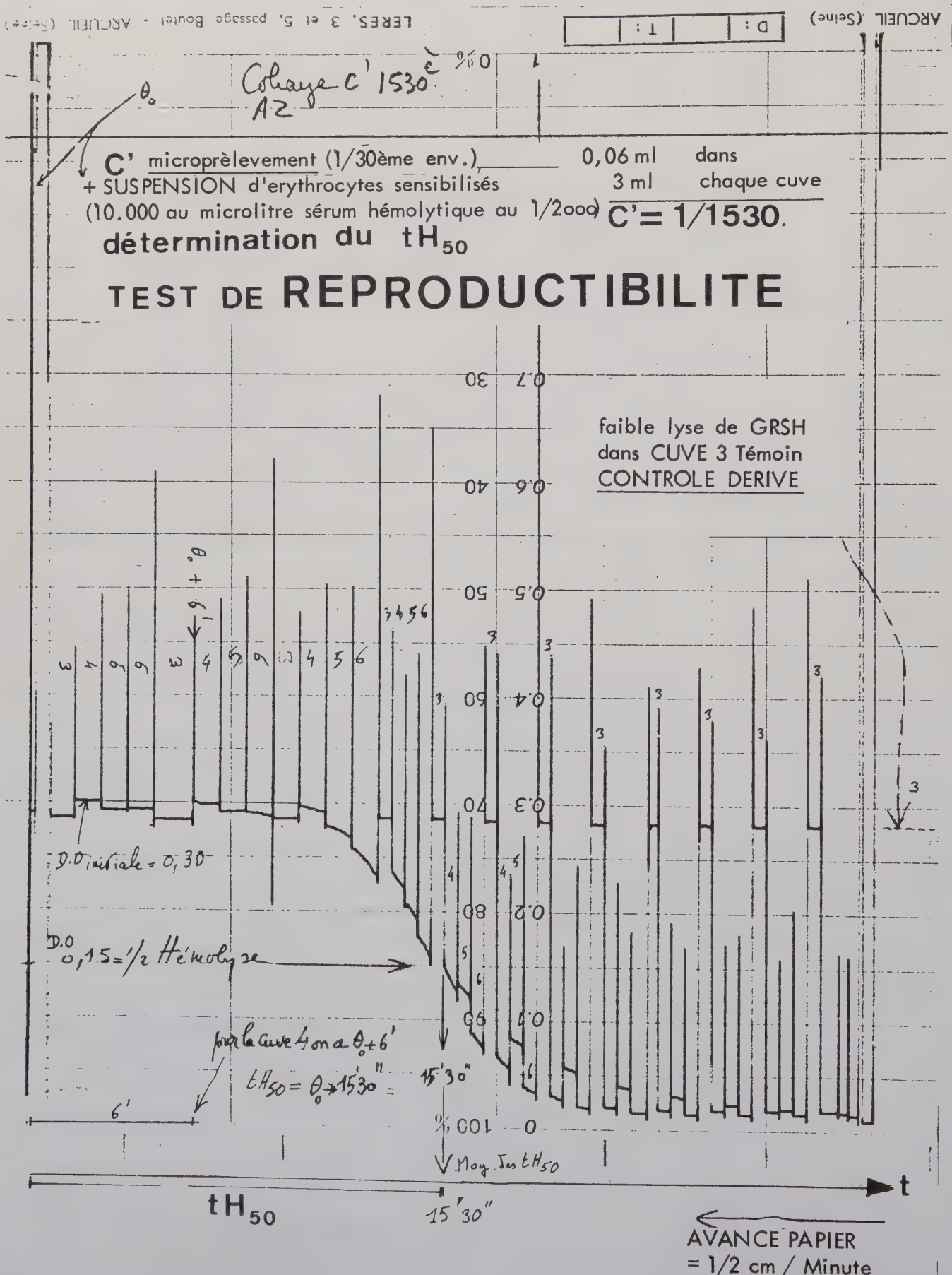
à l'éclosion.....	6 mn 36 sec
10 jours après l'éclosion.....	4 mn 30 sec
15 jours après l'éclosion.....	3 mn 45 sec
30 jours après l'éclosion.....	3 mn
60 jours après l'éclosion.....	2 mn 50 sec
120 jours après l'éclosion.....	2 mn 18 sec

Cette technique de dosage fournit des résultats reproductibles, comme le montrent les enregistrements suivants (les temps d'hémolyse tH50 peuvent être convertis en unités hémolytiques U.C'H50 : voir Page 84).

MICRO-DOSAGE DU COMPLEMENT

LERES, 3 et 5, passage Boulet - ARCUEIL (Seine)

ARCUEIL (Seine)



MICRO-DOSAGE DU COMPLEMENT

LERES, 3 et 5, passage Boulet - ARCUEIL (Seine)

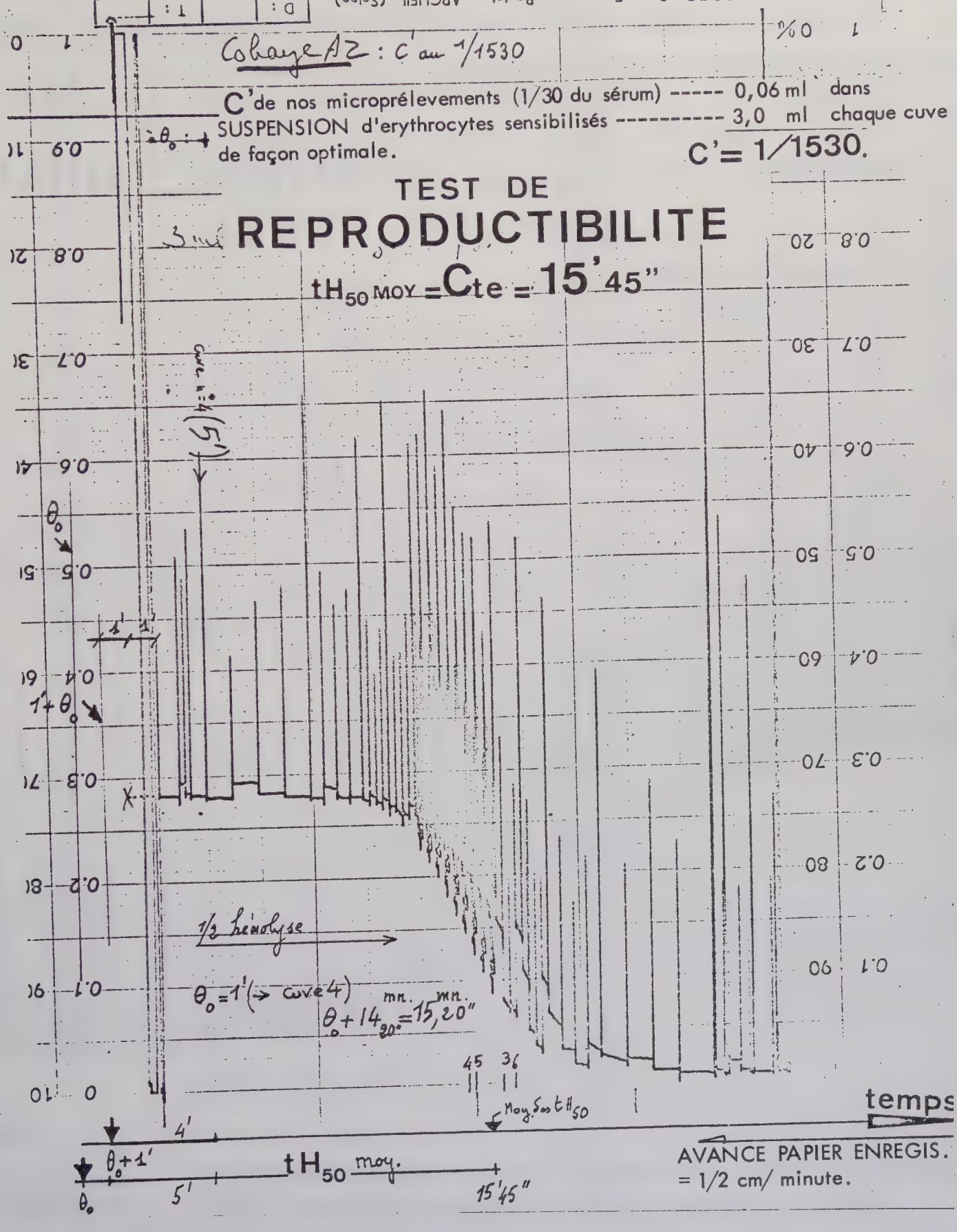
Cobaye AZ : C' au 1/1530

C'de nos microprélevements (1/30 du sérum) ----- 0,06 ml dans
SUSPENSION d'erythrocytes sensibilisés ---------- 3,0 ml chaque cuve
de façon optimale.

C'= 1/1530.

TEST DE REPRODUCTIBILITE

$tH_{50\ MOY} = Cte = 15'45''$



AVANCE PAPIER ENREGIS.
= 1/2 cm/ minute.

ERES, 3 et 5, passage Boutet - ARCUEIL (Sein

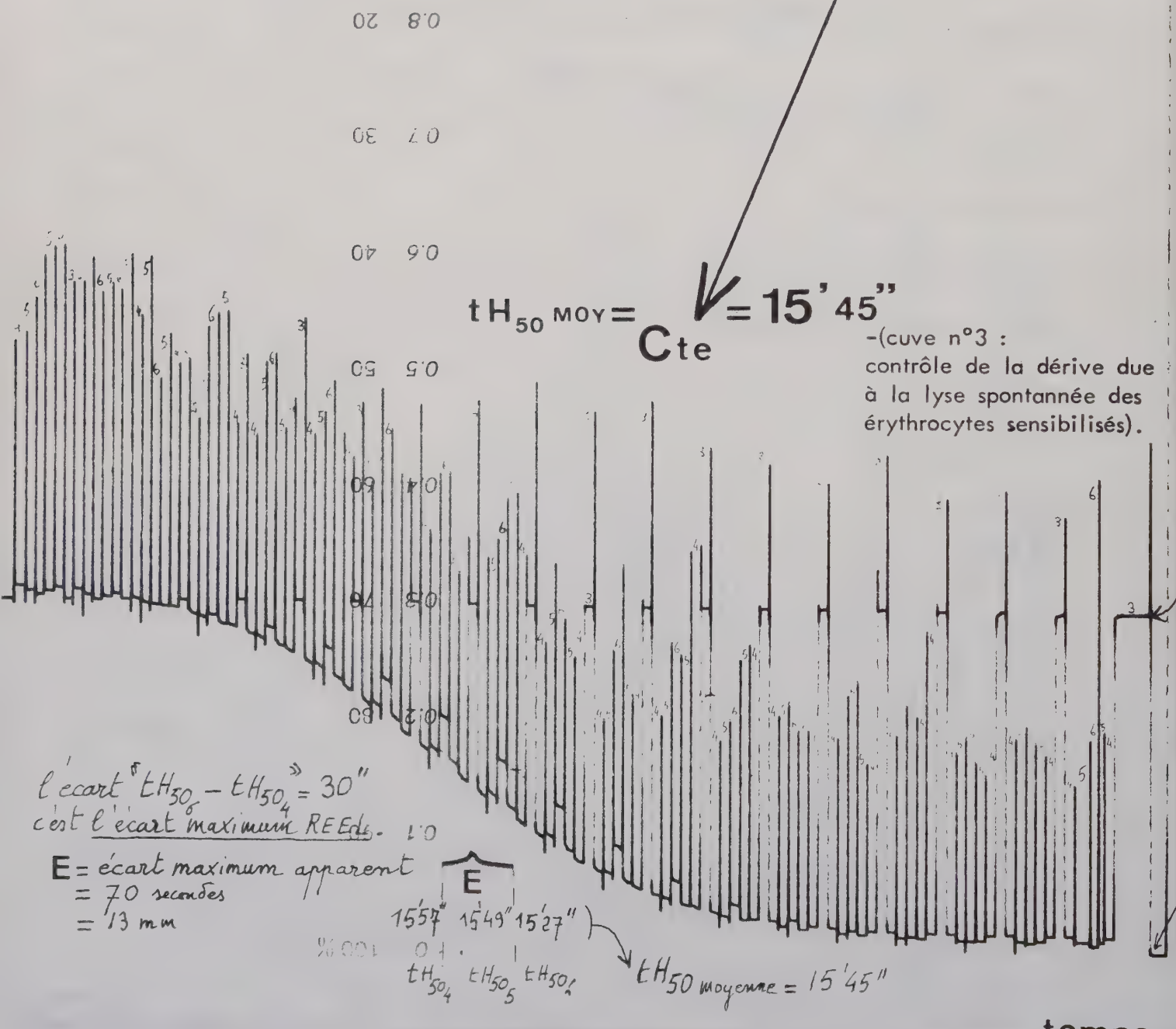
MICRO-DOSAGE DU COMPLEMENT

0,03 ml C' de notre micro-prélèvement (Cobaye AZ)
+ **suspension** d'érythrocytes sensibilisés à lyser (3ml).
C' au 1/1530ème

- (test de tenue des règlages : ici le 0% règlé en TRANSMISSION n'a pas varié dérive nulle).
- ⊗tenue du règlage de D.O = 0

...POUR TOUTES LES CUVES.

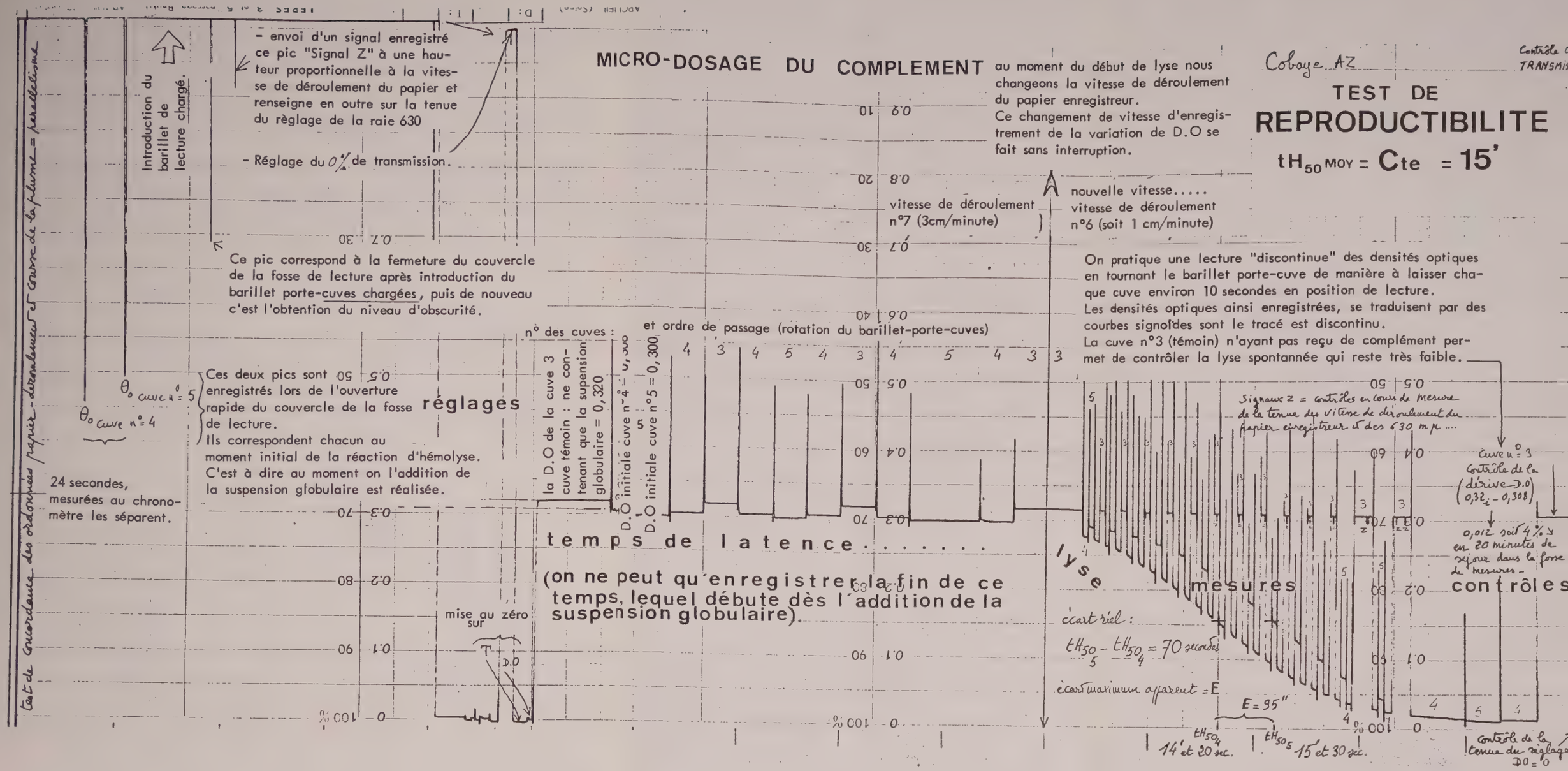
TEST DE REPRODUCTIBILITE



1cm / mn
AVANCE du PAPIER ENREGISTREUR

compte tenu du temps θ_o initial de la réaction hémolytique, necessairement différent pour chaque cuve, l'écart maximum réel entre les valeurs de tH_{50} qui s'inscrivent, est toujours inférieur à E, et, n'excede pas 10 % de la valeur absolue de la moyenne des tH_{50} expérimentaux

MICRO-DOSAGE DU COMPLEMENT



MICRO-DOSAGE DU COMPLEMENT

SERUMS DE POULETS

DE L'ECLOSION

AU

4ème MOIS

ENREGISTREMENT N°7

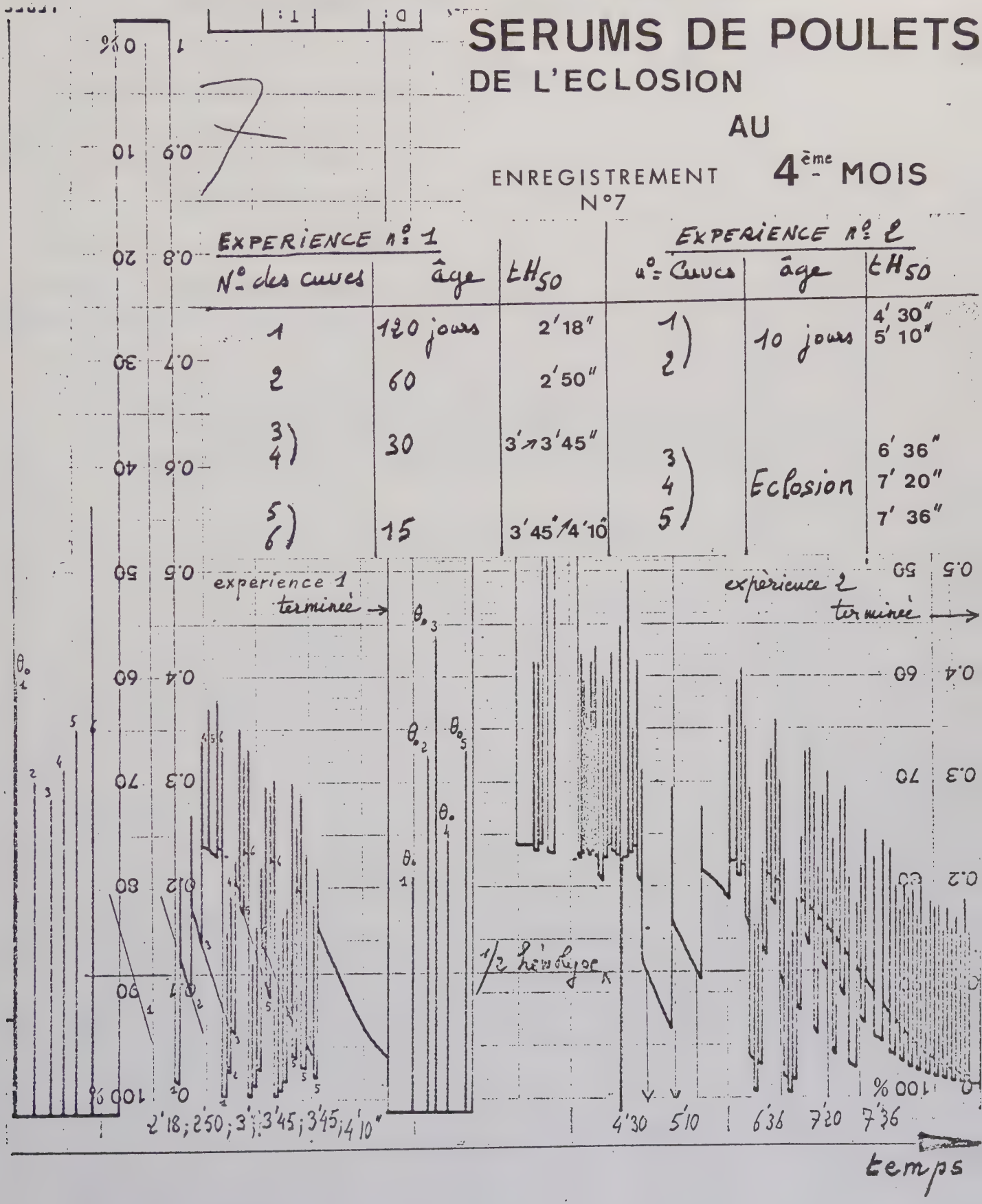
7

EXPERIENCE n° 1

N° des cuves	âge	tH_{50}
1	120 jours	2'18"
2	60	2'50"
3) 4)	30	3' à 3'45"
5) 6)	15	3'45 à 4'10

EXPERIENCE n° 2

n° Cuves	âge	tH_{50}
1) 2)	10 jours	4'30"
		5'10"
3) 4) 5)	Eclosion	6'36"
		7'20"
		7'36"



MICRO-DOSAGE DU COMPLEMENT

Vendredi 18.10.68

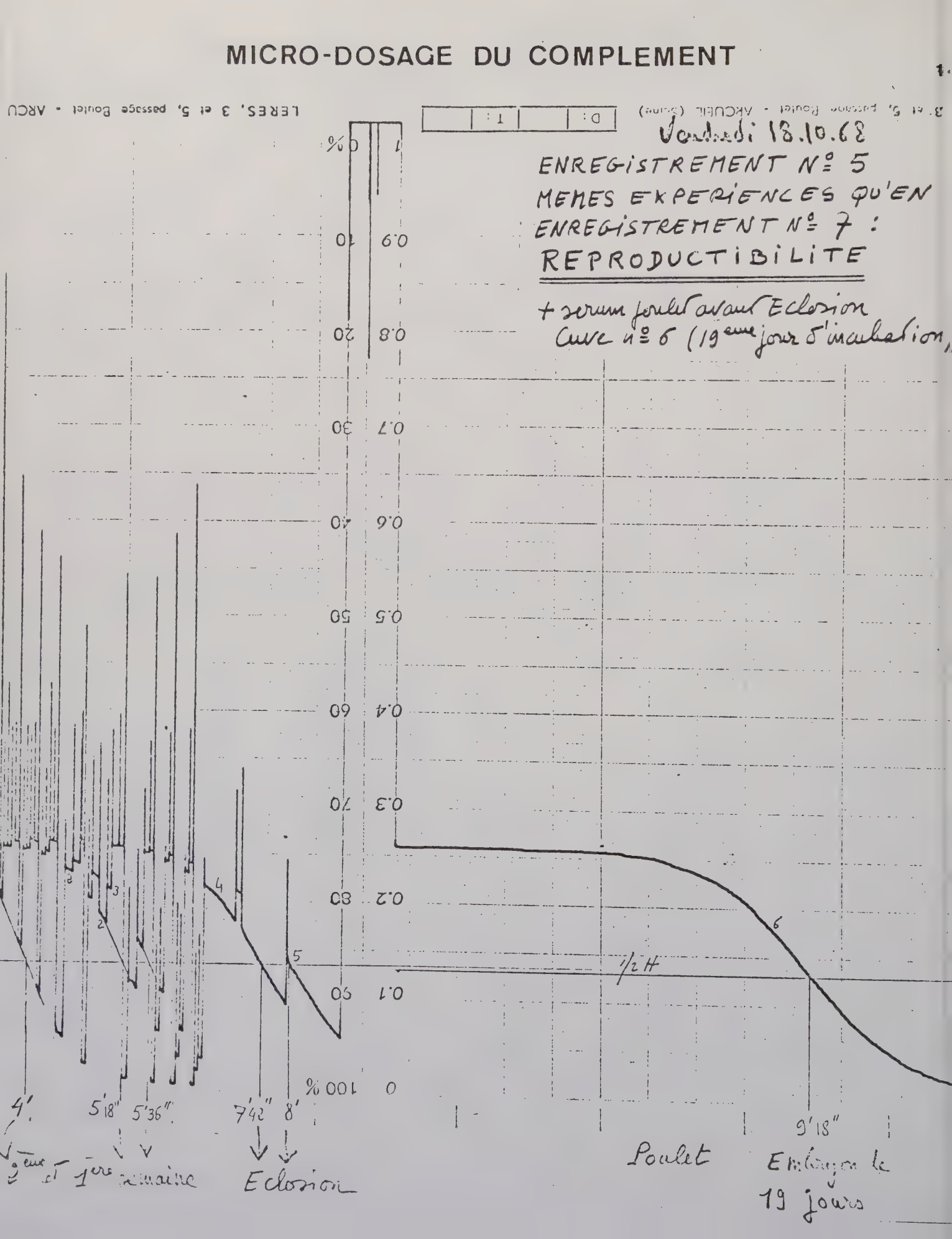
ENREGISTREMENT N° 5

MEMES EXPERIENCES QU'EN ENREGISTREMENT N° 7 :

REPRODUCTIBILITE

+ serum poulet avant Eclosion

Cuve n° 6 (19ème jour d'incubation)



II - IDENTIFICATION IMMUNOELECTROPHORETIQUE DE LA FRACTION BETA-1-C SUR SERUMS ET DANS LES DIFFERENTS EXTRAITS D'ORGANES CHEZ L'EMBRYON DE POULET.

A - Sur prélèvements à partir des ponctions veineuses classiques.

B - Sur prélèvements obtenus par notre microméthode.

C - Sur différents extraits d'organes chez l'embryon de poulet.

A - Sur prélèvements à partir des ponctions veineuses classiques.

Nous présentons ci-après un certain nombre de documents photographiques illustrant nos résultats expérimentaux.

Les images immunoélectrophorétiques obtenues montrent qu'après électrophorèse de sérum pur ou dilué (eau physiologique), provenant de l'exsudation classique (de 4 à 24 heures à la température du laboratoire) d'un volume de sang prélevé en quantité suffisante (macro-technique : 2 ml minimum) pour rendre praticable la séparation du sérum après exsudation et son utilisation, on a précipité une ou plusieurs protéines dont des globulines, parmi lesquelles certaines comme la Bêta-1-C appartiennent au système complément.

L'anticorps ou les anticorps correspondants : on a utilisé un immun-sérum spécifique monovalent (comme l'anti-Bêta-1-C) ou un immun-sérum spécifique polyvalent (comme l'anti-globuline ou bien encore : l'anti-sérum total).

D'après le nombre ou la position des arcs de précipitation obtenus, nous avons pu identifier la Bêta-1-C globuline cherchée (un seul arc de précipitation spécifique révélé par l'immun-sérum monovalent anti-Bêta-1-C globuline, déposé dans l'une des deux gouttières latérales, et, parmi d'autres, un arc de précipitation correspondant au premier, et révélé par l'immun-sérum polyvalent (anti-globulines ou anti-sérum total), déposé dans l'autre gouttière latérale (parallèle à la première et symétrique par rapport à l'axe de migration électrophorétique sur lequel se trouve le point de dépôt des antigènes.

Pages 161 et 162, les figures N° 21 et 22 correspondent aux résultats expérimentaux obtenus sur un sérum normal humain (SHN) frais (lames N° 9, 10 et 11) ou bien sur le même sérum vieilli (lame N° 8) après séjour de 3 semaines à 4°C. Chaque dilution de ces sérums a subi la

préparative. La recherche de l'antigène Bêta-1-C pour une même dilution du sérum normal humain au 1/3 a été positive avec l'immun-sérum monovalent anti-Bêta-1-C, jusqu'à la dilution 1/32.

1) Ces résultats reproductibles confirment la monovalence du sérum de chèvre anti-Bêta-1-C globuline humaine utilisé.

2) En outre, et sur les mêmes immunoélectrophorèses Fig. 21 et 22, un immun-sérum polyvalent (anti-sérum total humain) obtenu chez le lapin a été testé en parallèle de façon à rechercher la transformation de la Bêta-1-C en Bêta-1-A globuline lorsque le sérum (antigène) est vieilli (ou chauffé à 56° C -1 heure, ou encore, traité par hydrazine).

Le déplacement de l'arc de précipitation immuno-électrophorétique, de la position Bêta-1-C à la position Bêta-1-A (lame N° 8) permet, par comparaison avec les lames témoins (9, 10 et 11), de situer sur ces dernières l'arc de précipitation Bêta-1-Canti-Bêta-1C obtenu avec l'immun-sérum polyvalent (anti-SHN) frais et qui a disparu sur les lames correspondant à un sérum (le même) vieilli.

De plus, l'arc de précipitation obtenu sur la même lame avec l'immun-sérum monovalent anti-Bêta-1-C, est beaucoup moins dense sur la lame correspondant à l'électrophorèse de sérum vieilli (lame N° 8) que sur les lames témoins (9, 10 et 11) : pour le révéler, nous avons dû utiliser l'anti-sérum monovalent pur, alors qu'une concentration beaucoup plus faible (1/16) suffisait à le révéler sur les lames témoins correspondant à l'électrophorèse du même sérum avant vieillissement, c'est-à-dire frais. L'immun-sérum monovalent dont nous avons ce faisant vérifié la monovalence est donc un sérum riche en anticorps anti-Bêta-1-C et très spécifique : il ne donne en effet qu'un seul arc de précipitation immuno-électrophorétique bien qu'utilisé pur contre les fractions Bêta-1-C et Bêta-1-A d'un sérum vieilli par un séjour de 3 semaines à + 4° C pendant lequel presque toute la Bêta - 1 - C a été

a été transformée en Bêta-1-A. Mais l'immun-sérum monovalent étant riche en anticorps spécifiques anti-Bêta-1-C, il peut, utilisé pur, révêler le peu de Bêta-1-C restant dans le sérum vieilli (lame N° 8).

3) Les lames 8,9, 10 et 11 montrent une ligne de précipitation (précipitation rectiligne parallèle à l'axe de migration électrophorétique) parallèle aux gouttières de dépôt des sérums immuns.

Lorsqu'on utilise un anti-sérum total frais, outre les anticorps, ce sérum contient de la Bêta-1-C globuline : c'est le cas de notre immun-sérum polyvalent anti-sérum total (anti-sérum normal humain) obtenu chez le lapin. En dehors des anticorps produits par le lapin en réponse aux injections de sérum normal humain, ce sérum de lapin contient de la Bêta-1-C globuline de lapin. Or, la gouttière opposée est remplie avec l'immun-sérum monovalent anti-Bêta-1-C lequel ne contient que des anti-corps anti-Bêta-1-C humaine.

Indépendante de l'électrophorèse préparative, une double diffusion a lieu. Une précipitation rectiligne, parallèle aux "gouttières de dépôt des anticorps" est-elle le résultat de la rencontre de Bêta-1-C de lapin existant dans l'anti-sérum polyvalent (anti-SHN) et des anticorps anti-Bêta-1-C humaine produits par la chèvre ?

Si tel est le cas, ceci illustrerait les parentés antigéniques entre Bêta-1-C globulines d'origines différentes:

Ici, la Bêta-1-C d'origine humaine aurait en commun avec la Bêta-1-C d'origine cuniculine au moins un site antigénique. (Fig. N° 21 et 22 -lames N° 8 à 11).

Sinon, ce précipité rectiligne est le résultat de la rencontre de l'excès d'antigène β-1-A (qui a servi à épuiser l'anti-sérum monovalent anti Bêta-1-C) et des anti-Bêta-1-A produits par le lapin qui fournit le sérum polyvalent.

Quoi qu'il en soit, la possibilité qui s'offre de révêler la Bêta-1-C globuline d'une espèce à l'aide d'un anti-sérum monovalent anti-Bêta-1-C globuline d'une autre espèce, donc de ne révêler in vivo que de la Bêta-1-C globuline (MONOVALENCE) ,

recevra une application dans l'étude en immunofluorescence directe.

En attendant de présenter ce que notre étude en immunoélectrophorèse (C-) peut encore apporter dans ce sens, voyons les résultats expérimentaux obtenus à partir de sérum de cobaye isolé après exsudation classique de sang (macrométhode de ponction), résultats que nous comparerons ensuite avec ce que nous obtenions des prélèvements dus à notre microméthode (exsudation d'une goutte de sang frais dans 14 gouttes de Tampon Mayer) chez le même animal.

- Identification de B-1-C sur prélèvements classiques. Tests sur sérum de cobaye frais

Les prélèvements classiques de sang autorisent la séparation après exsudation, d'un volume de sérum pur manipulable c'est-à-dire en quantité suffisante pour être recueilli et aussi, pour fournir la dilution au 1/3 en quantité suffisante pour dépos dans les trous cylindriques pratiqués au centre du film de gélose (dépos de l'antigène).

Pour révéler la globuline Bêta-1-C qui, parmi les protéines sériques migre à l'électrophorèse préparative, il faut que cette globuline existe en quantité suffisante dans le sérum à analyser. Or, les sérums frais en sont riches et plus particulièrement les sérums frais de cobaye. De plus, la concentration en anticorps anti-Bêta-1-C de l'immun sérum utilisé est importante : en effet notre immun-sérum de lapin anti-sérum total de cobaye a été préparé par immunisation du lapin contre du sérum frais de cobaye de façon à obtenir une réponse anti-Bêta-1-C nette : Ce sérum ne contient pas d'anticorps anti-Bêta-1-A globuline, la Bêta-1-A étant absente in vivo, absente du sérum frais qui a été injecté au lapin.

On peut dans ces conditions remarquer sur nos documents (figure n° 23) l'arc de précipitation spécifique, immunoélectrophorétique, correspondant à la globuline Bêta-1-C et lui seul (pas d'arc de précipitation correspondant à la Bêta-1-A globuline, produit de dégradation de la Bêta-1-C avec le temps) (visible sur les lames 15 et 16 figure n° 23).

- On a, en outre, cherché à identifier sur sérum de cobaye frais la Bêta-1-C globuline de cobaye à l'aide du sérum de chèvre anti-Bêta-1-C globuline humaine (dont on avait vérifié la monovalence : figure 21 et 22). Les résultats sont négatifs même lorsqu'on utilise l'immun sérum PUR (figure n°23, lame n° 16, gouttière du bas).

Contrairement à la Bêta-1-C globuline de lapin (fig. 21 et 22) la Bêta-1-C de cobaye n'aurait donc pas de parenté antigénique avec la Bêta-1-C globuline humaine...

- Identification de B-1-A sur prélèvements classiques. Tests sur sérum de cobaye vieilli.

Nous avons gardé du sérum pur et frais de cobaye une partie que nous avons laissé "vieillir" 3 semaines à + 4°C.

Pour révéler la globuline Bêta-1-A qui, parmi les protéines sériques migre à l'électrophorèse préparative, il faut que cette globuline existe en quantité suffisante dans le sérum vieilli à analyser. Or, un séjour de 3 semaines à + 4°C enrichit les sérums en Bêta-1-A globuline et plus particulièrement les sérums de cobaye qui contiennent beaucoup de Bêta-1-C à dégrader. De plus, la concentration en anticorps anti-Bêta-1-A de l'immun sérum utilisé est importante : en effet, notre immun-sérum de lapin anti-sérum total de cobaye a été préparé cette fois par immunisation du lapin contre du sérum vieilli de cobaye de façon à obtenir une réponse anti-Bêta-1-A nette : Ce sérum ne contient pas d'anticorps anti-

-Bêta-1-C globuline, la Bêta-1-C étant absente in vitro si le vieillissement est important (3 semaines) absente du sérum vieilli qui a été injecté au lapin.

On peut, dans ces conditions, remarquer sur nos documents (fig. n° 24, lames 12, 13 et 14 double diffusion supérieure) l'arc de précipitation spécifique, immunoélectrophorètique correspondant à la Bêta-1-A, à l'exclusion de l'arc Bêta-1-C - anti-Bêta-1-C. Cependant, d'autres produits de la dégradation de la Bêta-1-C peuvent interférer (Bêta-1-G ; α'_2D de West, Davis et Forristal) - West. C.D.-1966) - (CARPENTIER C.B.-1966).

D'autre part, nous avons sur ces mêmes lames (lames n° 12, 13 et 14 figure n° 24) révélé à l'aide d'un immunsérum anti-IG- de cobaye (Institut Pasteur) les immuno-globulines de cobaye pour les différencier des arcs de précipitation correspondant aux autres protéines du sérum de cobaye vieilli.

B - Sur prélèvements obtenus par notre microméthode.

Nous devons ici rappeler brièvement en quoi consistent ces prélèvements sur lesquels nous avons dosé le complément, ou cherché à identifier sa fraction Bêta-1-C : parce que notre microméthode d'obtention de ces prélèvements et les méthodes d'analyse qui suivent doivent rester liées par la cinétique de préparation des réactifs labiles et surtout par celle du sérum support de la Bêta-1-C chronolabile.

Ainsi, lorsqu'on laisse un volume de sang prélevé (1 goutte) tomber dans 14 volumes (14 gouttes, les mêmes) de tampon Mayer à 37°C, l'exsudation s'effectue à 37°C à pH 7,3 et sa durée est fixée à 90 minutes. Cette exsudation est suivie d'une courte centrifugation à froid et d'une conservation à + 4° C jusqu'à son utilisation du surnageant.

Le protocole est le même, qu'il s'agisse d'y doser le complément par la microméthode d'enregistrement de l'opacimétrie d'une suspension d'érythrocytes non lysés, ou qu'il s'agisse de l'identification immunoélectrophorétique de la fraction Bêta-1-C ou bien encore, de l'identification immunoélectrophorétique de la globuline Bêta-1-A, produit de dégradation de la Bêta-1-C (vieillissement ou traitement du sérum par l'Hydrazine) de nos prélèvements.

Nous avions évalué à 1/30 la concentration du sérum dans le tampon Mayer où l'exsudation et la dilution se font ensemble.

Nous pouvons évaluer aussi le volume de surnageant obtenu :

1 + 14 x 0,02 ml = 0,3 ml
0,3 ml - le volume du culot de centrifugation (caillot rétracté) soit en théorie :
0,3 ml - 0,01 ml environ ## 0,29 ml

Le volume de surnageant séparable est évalué à 0,2 ml (en pratique). Ce qui autorise le remplissage (0,035 à 0,040 ml) de 4 ou 5 trous de "dépôt antigène", soit une électrophorèse préparative de 4 ou 5 lames identiques. Cette électrophorèse est réalisée en 80 minutes et terminée dans les 3 heures suivant le prélèvement de la goutte de sang chez le cobaye.

Dans ces conditions, il est possible, malgré la dilution inhabituelle de l'antigène (1/30) et malgré le pH=7,3 du tampon de dilution de réaliser la précipitation immunoélectrophorétique de quelques fractions sériques dont la Bêta-1-C, si l'on prend soin, pour révéler ces fractions séparées à l'électrophorèse et dont la concentration est faible, d'utiliser un immun-sérum anti-sérum de cobaye à son optimum de concentration (zone d'équivalence Ag-Ac). La dilution de l'anticorps

au 1/16 a donné les meilleurs résultats. En outre l'identification de la Bêta-1-C globuline nécessite l'utilisation au 1/16me d'un immun-sérum anti-sérum frais, notre immun-sérum de lapin, anti-sérum total frais de cobaye. (Fig. n° 25,lame 17).

- Utilisation de l'Hydrazine pour obtenir la transformation de la Bêta-1-C en Bêta-1-A : identification immunoélectrophorètique de la globuline Bêta-1-A sur notre microprélèvement après incubation avec une solution d'Hydrazine.

Solution d'Hydrazine : H

Hydrazine chlorhydrate	100 mg
Eau physiologique	150 ml

Solution H

Solution H	0,02 ml
Surnageant (1/30)	0,20 ml

(microprélèvement de sérum de cobaye)

Incubation 1 heure à 37°C en tube à hémolyse

réalisation du mélange à incuber :

1 microgouttes de solution H (utilisation de notre
+ 10 ———————— de surnageant (microcompte-gouttes
(voir Fig. n° 1)

Electrophorèse du mélange après incubation :

Voir fig. n° 25, lame n° 18

Si le sérum de cobaye frais est dilué au 1/30ème sur le témoin (lame n° 17, fig. 25) on peut évaluer à 1/33 environ la dilution du sérum traité (lame n° 18).

Un immunsérum de lapin anti-sérum vieilli de cobaye dilué au 1/16 révèle l'arc de précipitation immunoélectrophorétique correspondant à la précipitation de la Bêta-1-A globuline (issue de la Bêta-1-C transformée) par les anticorps anti-Bêta-1-A produits par le lapin contre la Bêta-1-A de sérum vieilli de cobaye.

Comparaison des résultats expérimentaux obtenus en immunoélectrophorèse, entre prélèvements à partir des ponctions veineuses classiques et prélèvements obtenus par notre micro-méthode.

Avec les prélèvements classiques, on peut utiliser, à l'électrophorèse, (de l'antigène), le sérum pur ou peu dilué et ainsi, obtenir des fractions denses.

De plus, l'immun-sérum, s'il est lui aussi peu dilué, produira des arcs de précipitation bien marqués. Ce qui se traduit par des images contrastées (fig. N° 26 lames 19 à 22). Ces lames ont été réalisées avec un sérum frais de cobaye (dépôt de l'antigène) utilisé au 1/3, et avec notre immun-sérum de lapin anti-sérum frais de cobaye, utilisé pur.

Cependant, les lames les plus "belles" (netteté contraste, nombre d'arcs obtenus) ne sont pas toujours les plus révélatrices :

En effet, nous voulons pour exemple leur opposer les lames obtenues sur nos micro-prélèvements qui, on l'a vu, réalisent d'emblée une dilution plus importante du sérum (1/30 environ). (Fig. N° 25, lames 17 et 18) : parmi les fractions antigéniques séparées à l'électrophorèse, seules les fractions dont la concentration est suffisante sont révélées par l'immun-sérum qui, dilué, gagne en spécificité et ne donne de précipités qu'avec les fractions les plus antigéniques.

Mais surtout, notre microméthode de prélèvements de sang élève le seuil de réponse des tests qualitatifs (voir immuno-électrophorèses obtenues sur sérum prélevé par la macrométhode classique et dilué au 1/30, (antigène), où nos immun-sérums de lapin anti-sérum frais ou vieilli de cobaye, dilués au 1/16, anticorps : fig. N° 27 - lames N° 23 et 24, n'ont pas pu former d'arc de précipitation immunoélectrophorétique en position Bêta-1-C ou Bêta-1-A. De plus, les arcs de précipitation correspondant aux autres fractions sériques sont nettement moins denses, ce qui tendrait à prouver que nous avons sous-estimé la concentration du sérum, de nos microprélèvements lorsque nous

avons évalué leur concentration à 1/30 (Comparer les Figures nº-25 et nº 27).

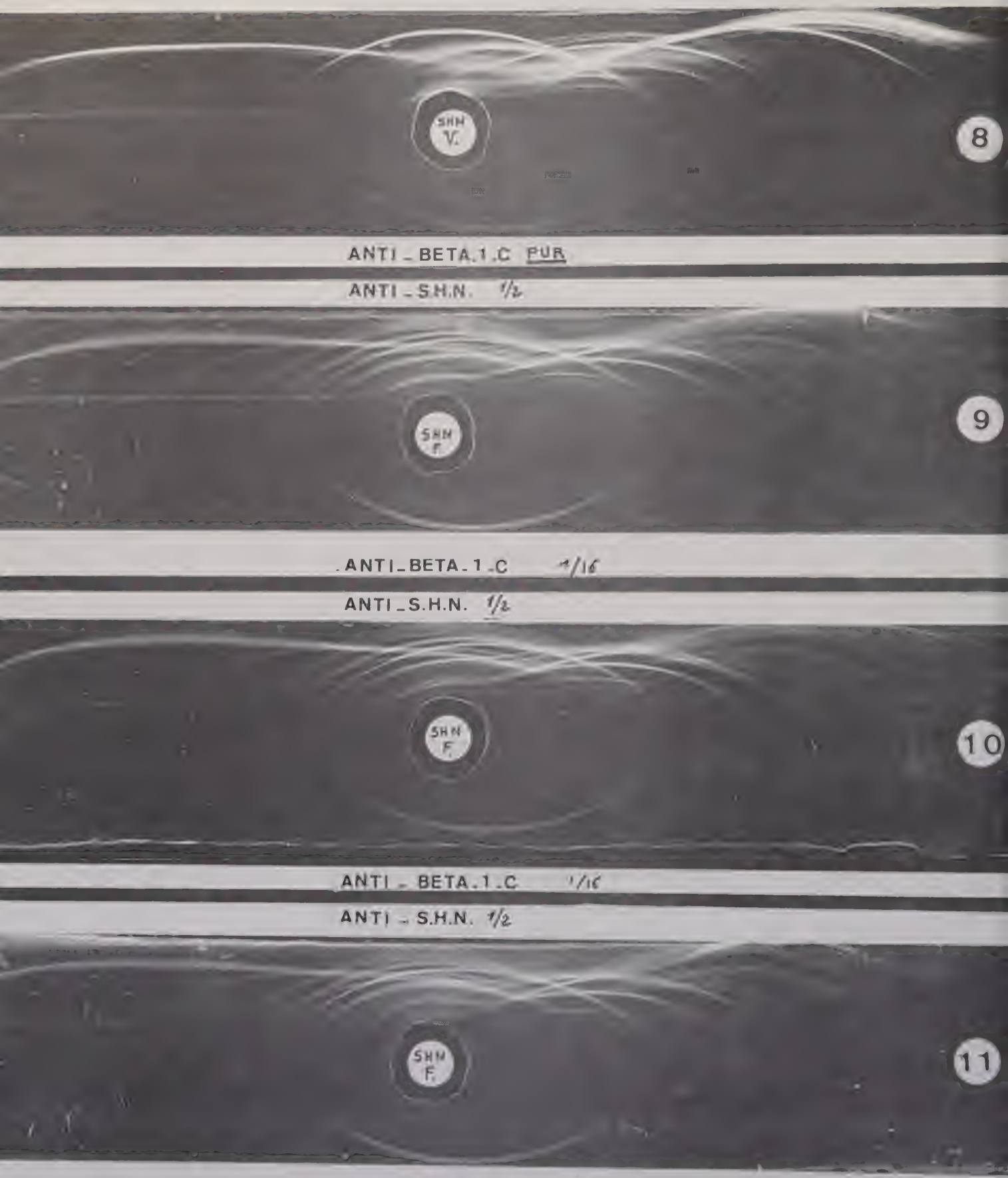
En résumé :

Les épreuves immuno-électrophorétiques d'identification de la fraction Bêta-1-C donnent les résultats suivants :

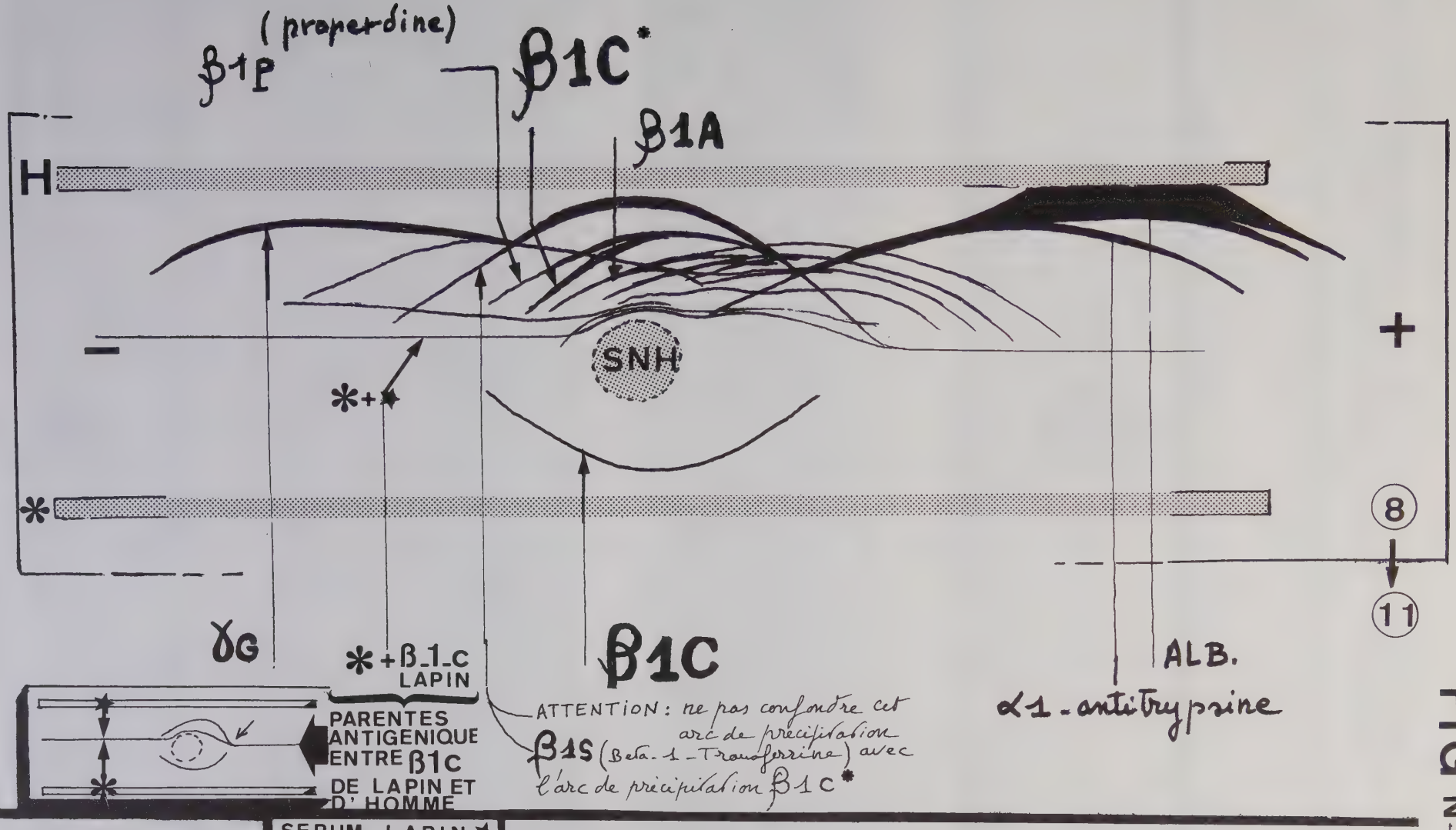
- confirmation de la monospécificité de l'anti-Bêta-1-C : 1 seul arc (voir Page 161)
- transformation de la fraction Bêta-1-C en Bêta-1-A :
  - . après vieillissement (Page 164)
  - . après action de l'hydrazine (Page 165)

FIG N° 21

Vérification de la monovalence de l'immun-sérum anti-ß-1 c



SHN = SERUM HUMAIN NORMAL
V = VIEILLI | DILUE AU 1/3
F = FRAIS



IDENTIFICATION

DES ARCS DE PRECIPITATION SUR LES IMMUNO ELECTROPHORESES N° 8 à 11

FIG N° 22

identification de ß_1_C sur prélèvements classique
_tests sur serum de cobaye frais.

pas de parenté antigenique ß_1C cob./ß_1C homm

— +

IMMUN SERUM DE LAPIN ANTI_SERUM FRAIS DE COBAYE

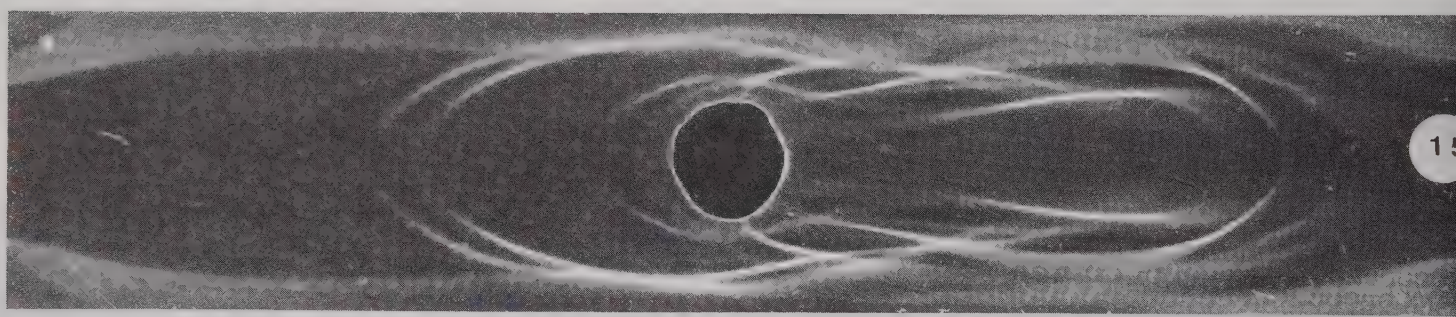
1/8

ß_1_C SERUM COBAYE FRAIS DILUE AU 1/3

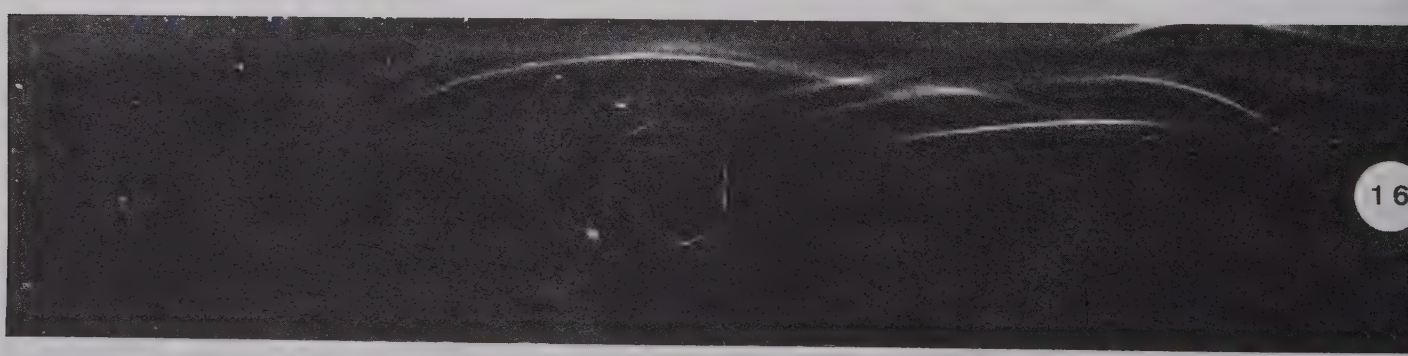
15

1/8

IMMUN SERUM DE LAPIN ANTI_SERUM FRAIS DE COBAYE



— +



IMMUN SERUM DE LAPIN ANTI_SERUM FRAIS DE COBAYE

ß_1_C

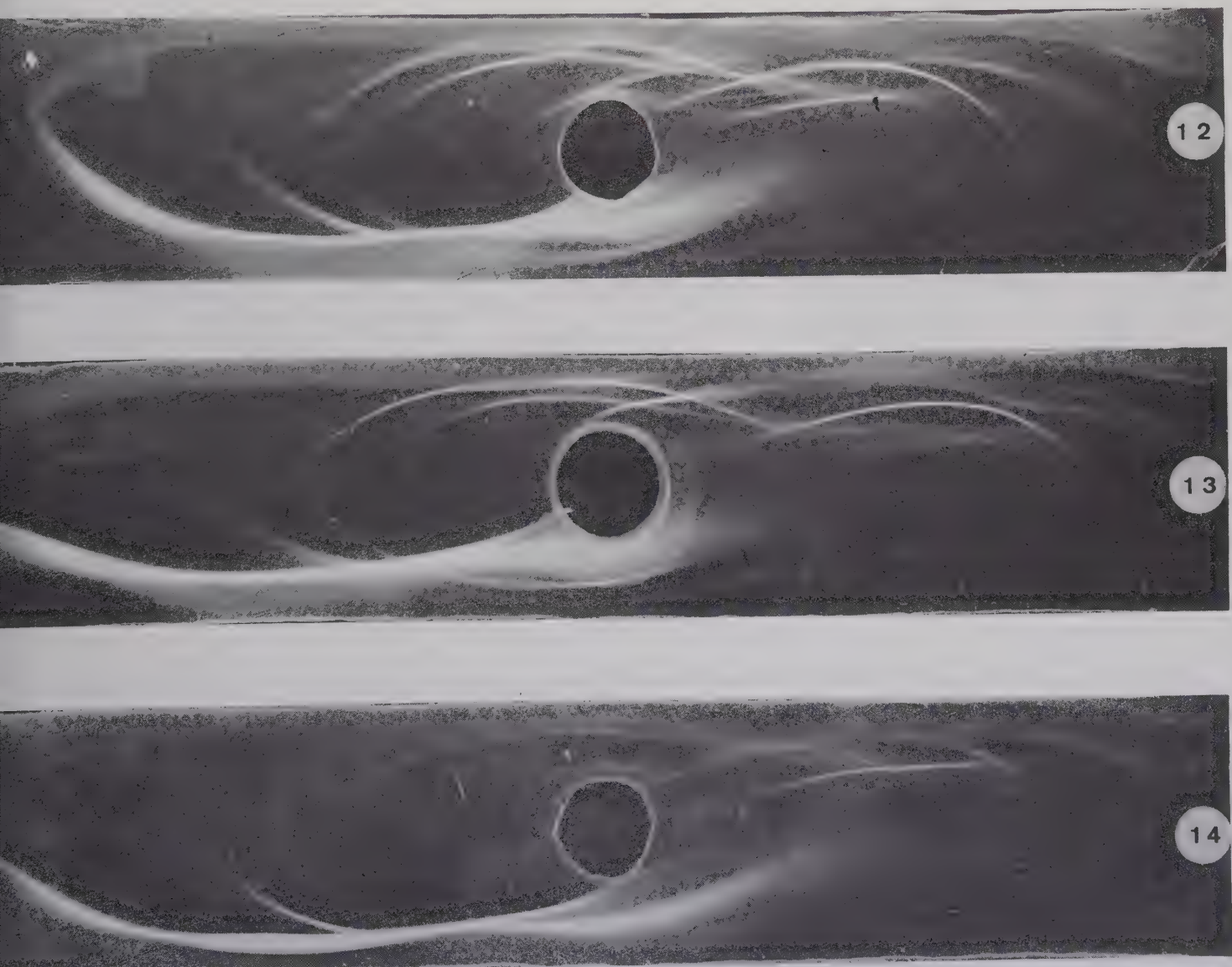
1/8

SERUM COBAYE FRAIS DILUE AU 1/3

16

IMMUN SERUM DE CHEVRE ANTI ß_1_C HUMAINE - Pur -

identification de ß_1_A sur prelèvements classiques. – tests sur sérum de cobaye vieilli.



IDENTIFICATION DE β_1_C

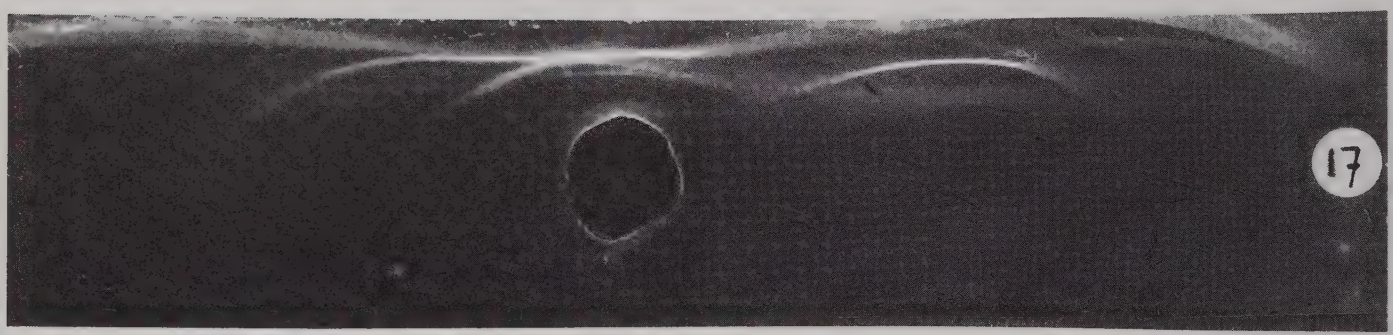
FRAIS, ET INDIRECTEMENT, PAR MISE EN EVIDENCE DE β_1_A SUR LE MEME PRELEVEMENT INCUBE AVEC HYDRAZINE.

→ ELEVATION DU SEUIL DE REPONSE DES TESTS, PAR RAPPORT AUX RESULTATS OBTENUS SUR MACRO PRELEVEMENTS: COMPARER LES TESTS CI DESSOUS AVEC CEUX DE LA FIGURE N° 27

IMMUN_SERUM DE LAPIN ANTI_SERUM FRAIS DE COBAYE. 1/16

arc anti-β1.C – β.1C

SERUM FRAIS COBAYE (AU 1/30e.) * | MICROMETHODE DE PRELEVEMENT (17)



_ — + IMMUN_SERUM DE LAPIN ANTI_SERUM VIEILLI DE COBAYE. 1/16

arc anti-β1A – β.1A

I.D.E.M* + HYDRAZINE (18)

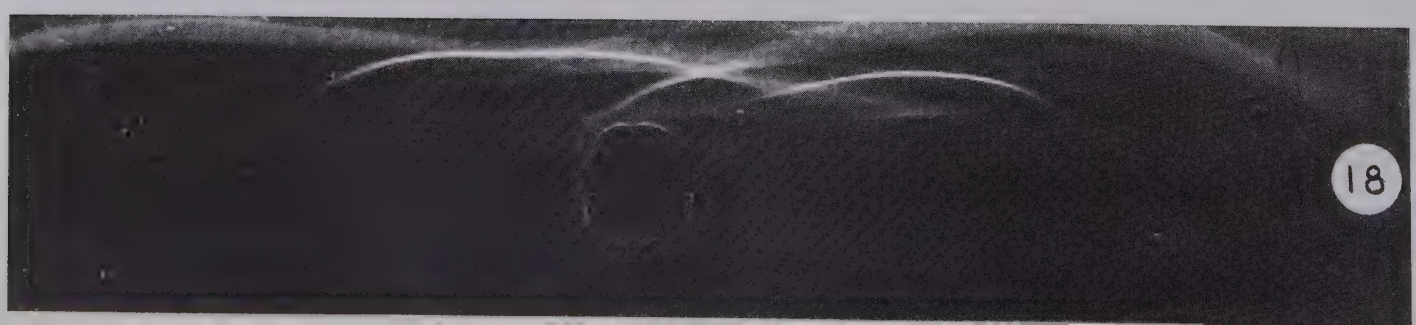


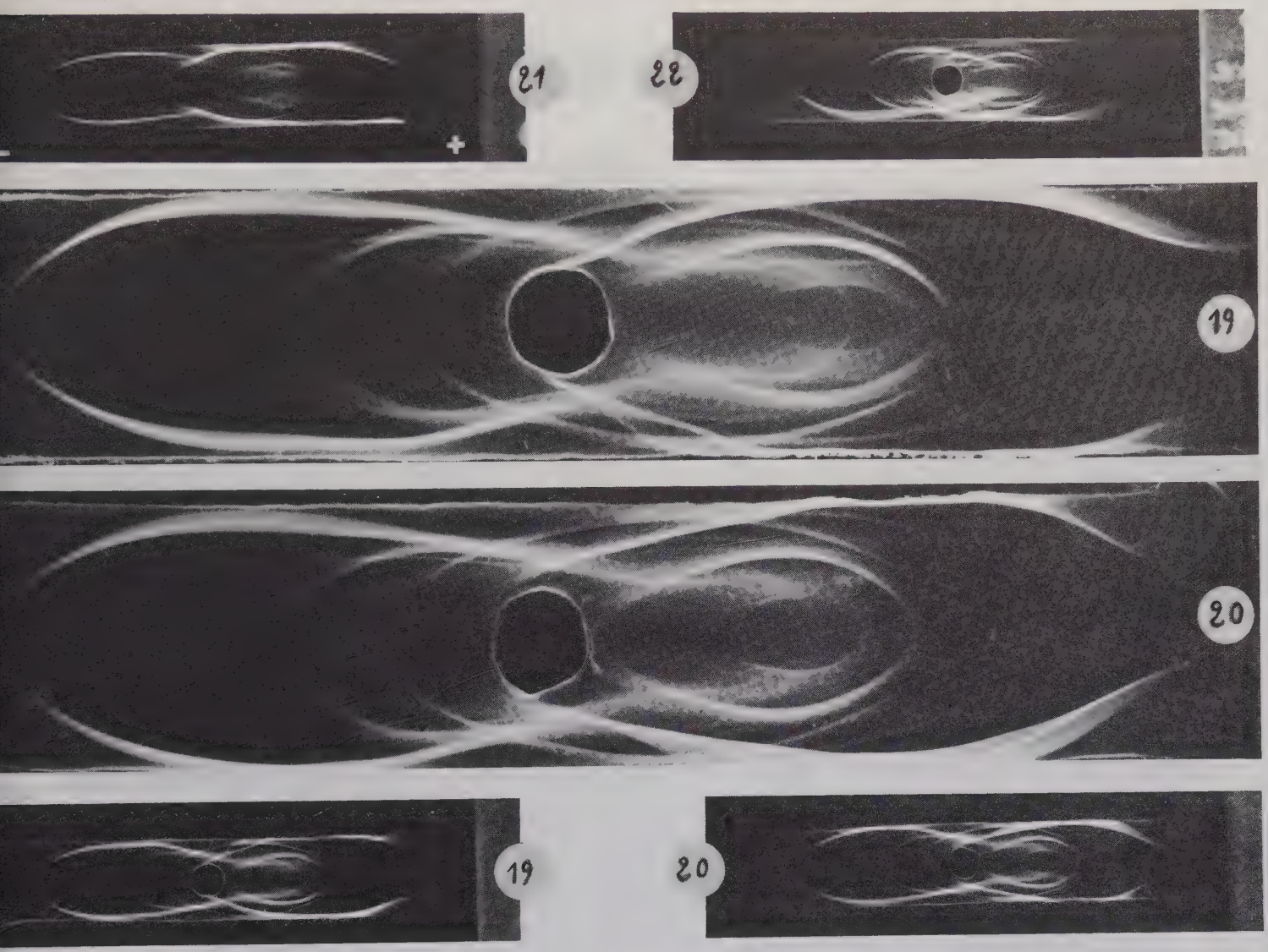
FIG. N°26

−

+

L'UTILISATION DU SERUM EXSUDE PUR A SES AVANTAGES :

AVEC DES PRELEVEMENTS DE SERUM PUR (MACROMETHODES) CLASSIQUES, ON PEUT UTILISER L'ANTIGENE CONCENTRE : IMPORTANTS PRECIPITES ... & CONTRASTES



...ET MULTIPLICATION DES ESSAIS

NOTRE IMMUN SERUM DE LAPIN ANTI SERUM FRAIS DE COBAYE, PUR.....

ANTIGENE = SERUM FRAIS DE COBAYE AU $\frac{1}{3}$

NOTRE IMMUN SERUM DE LAPIN ANTI SERUM FRAIS DE COBAYE, PUR.....

FIG. N: 27

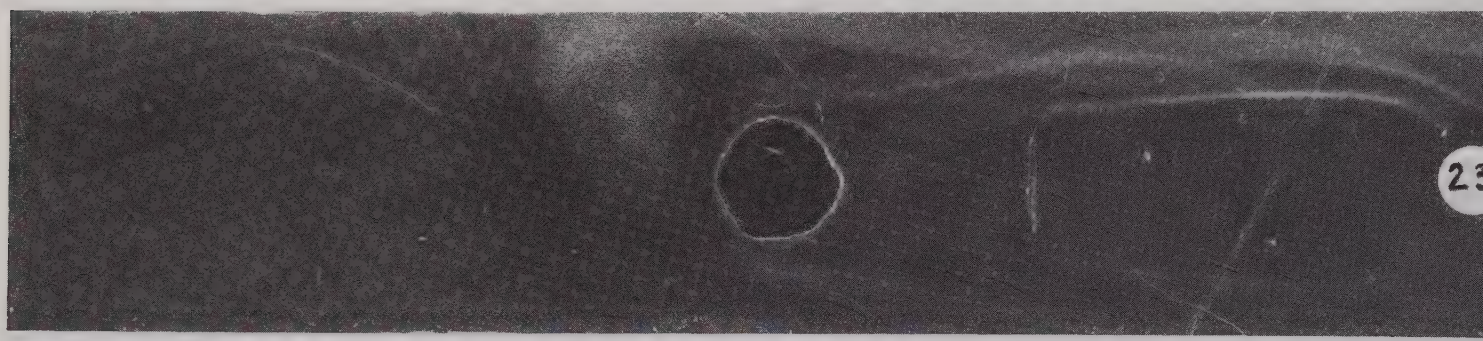
··· MAIS LE SEUIL DE REPONSE SUR MACROPRELEVEMENTS EST BAS

IMMUNSERUM DE LAPIN ANTI SERUM FRAIS DE COBAYE 1/16

pas d'arc anti-β1.c – β.1.c

SERUM COBAYE FRAIS AU 1/30 | MACRO METHODE DE PRELEVEMENT (23)

IMMUNSERUM DE LAPIN ANTI SERUM VIEILLI DE COBAYE 1/16



IMMUNSERUM DE LAPIN ANTI SERUM FRAIS DE COBAYE 1/16

SERUM COBAYE VIEILLI AU 1/30 | MACRO METHODE DE PRELEVEMENT (24)

pas d'arc anti-β.1.7 – β.1.A

IMMUNSERUM DE LAPIN ANTI SERUM VIEILLI DE COBAYE 1/16

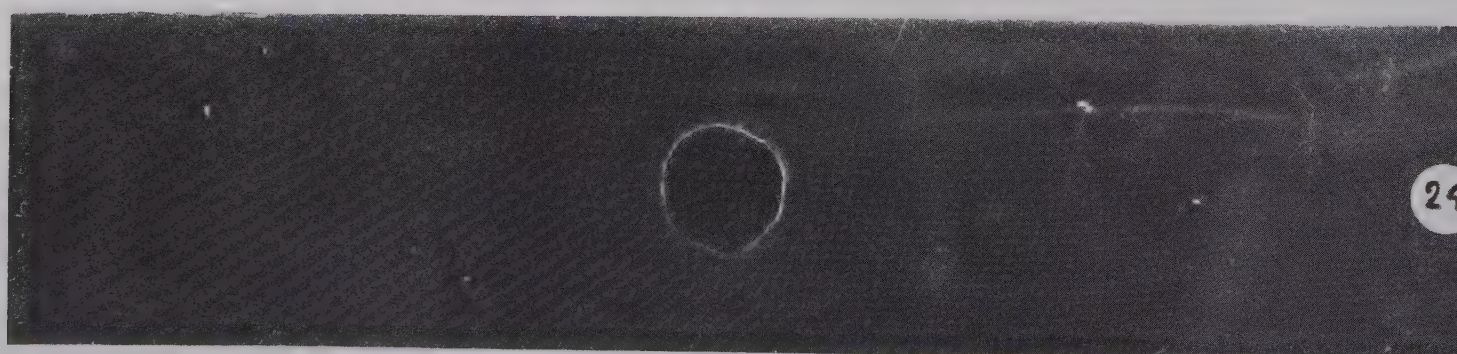
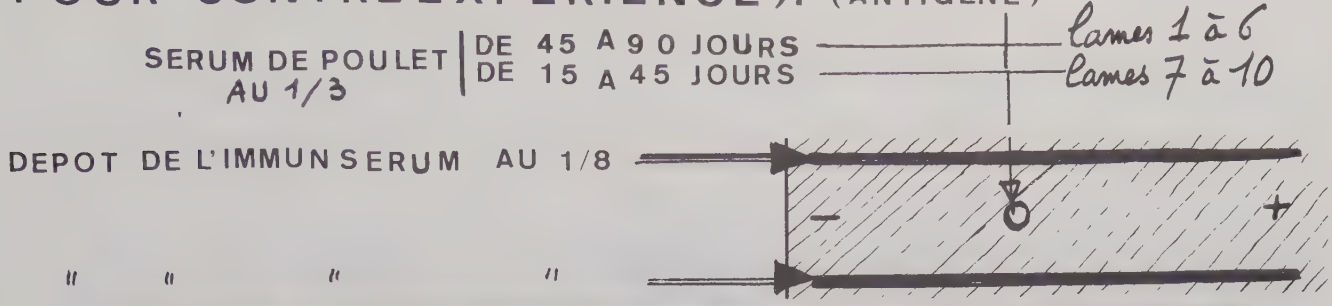
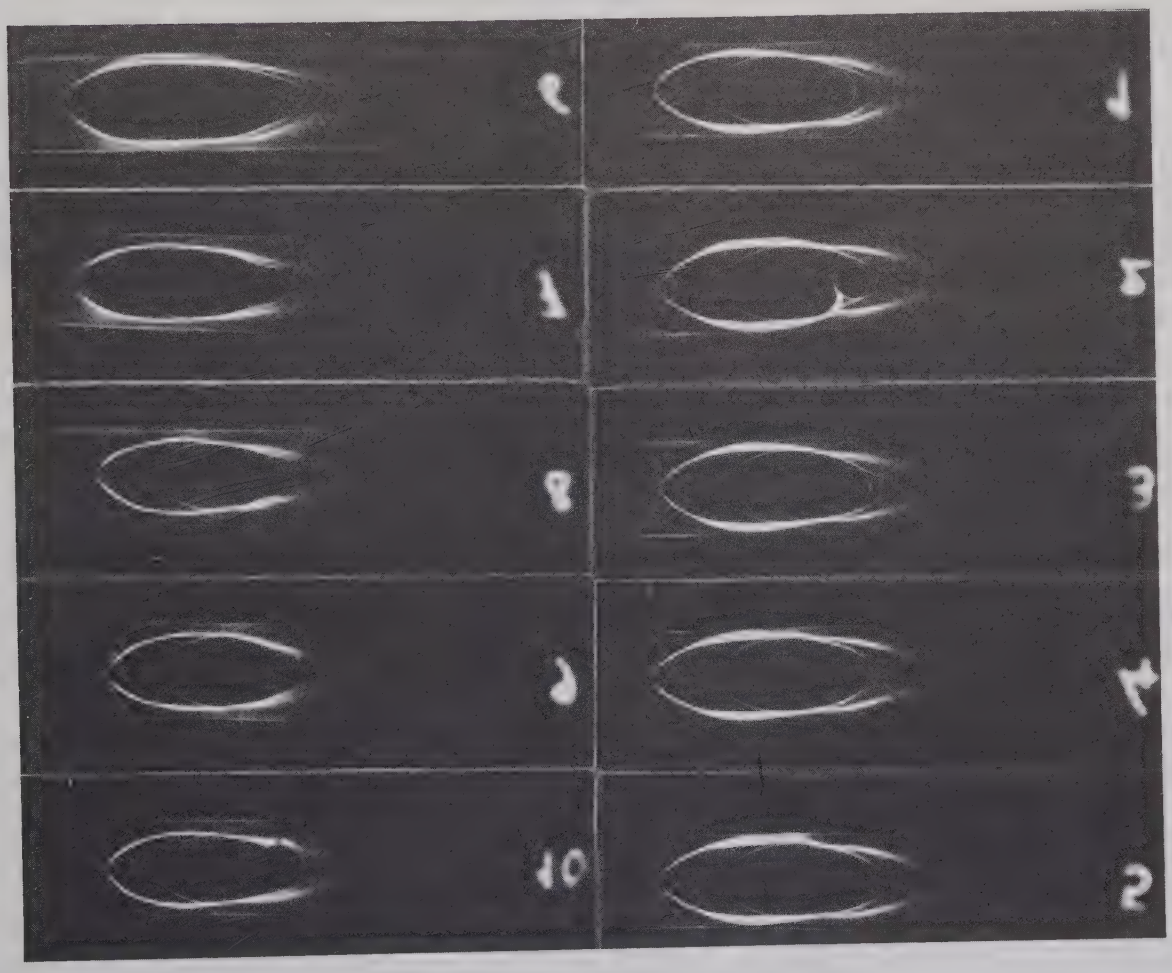


FIG N: 29

VERIFICATION IMMUNOELECTROPHORETIQUE DE LA SPECIFICITE DE L'IMMUNSERUM ANTI-IG DE POULE (A UTILISER EN IMMUNOFLUORESCENCE POUR CONTREEXPERIENCE). (ANTIGENE)





C - Sur différents extraits d'organes chez l'embryon de poulet.

- Identification immunoélectrophorétique de la globuline B-1-C sur broyat d'intestin FRAIS de poulet à l'éclosion. Utilisation de l'immun-sérum de chèvre, monovalent anti-Beta-1-C humaine, comme anticorps. (Fig. n° 28)

La préparation de l'antigène est simple :
des morceaux de l'intestin terminal (gros intestin) sont finement coupés puis lavés en eau physiologique. On pratique un broyage du tissu frais dans un tube à essais, préalablement refrigéré à -25° C. On procède donc à l'électrophorèse directe sur tissu grossièrement broyé, frais.

Dans ces conditions, l'immun-sérum monovalent anti - Beta-1-C humaine utilisé pur produit un seul arc de précipitation immuno-électrophorètique en position Beta-1.

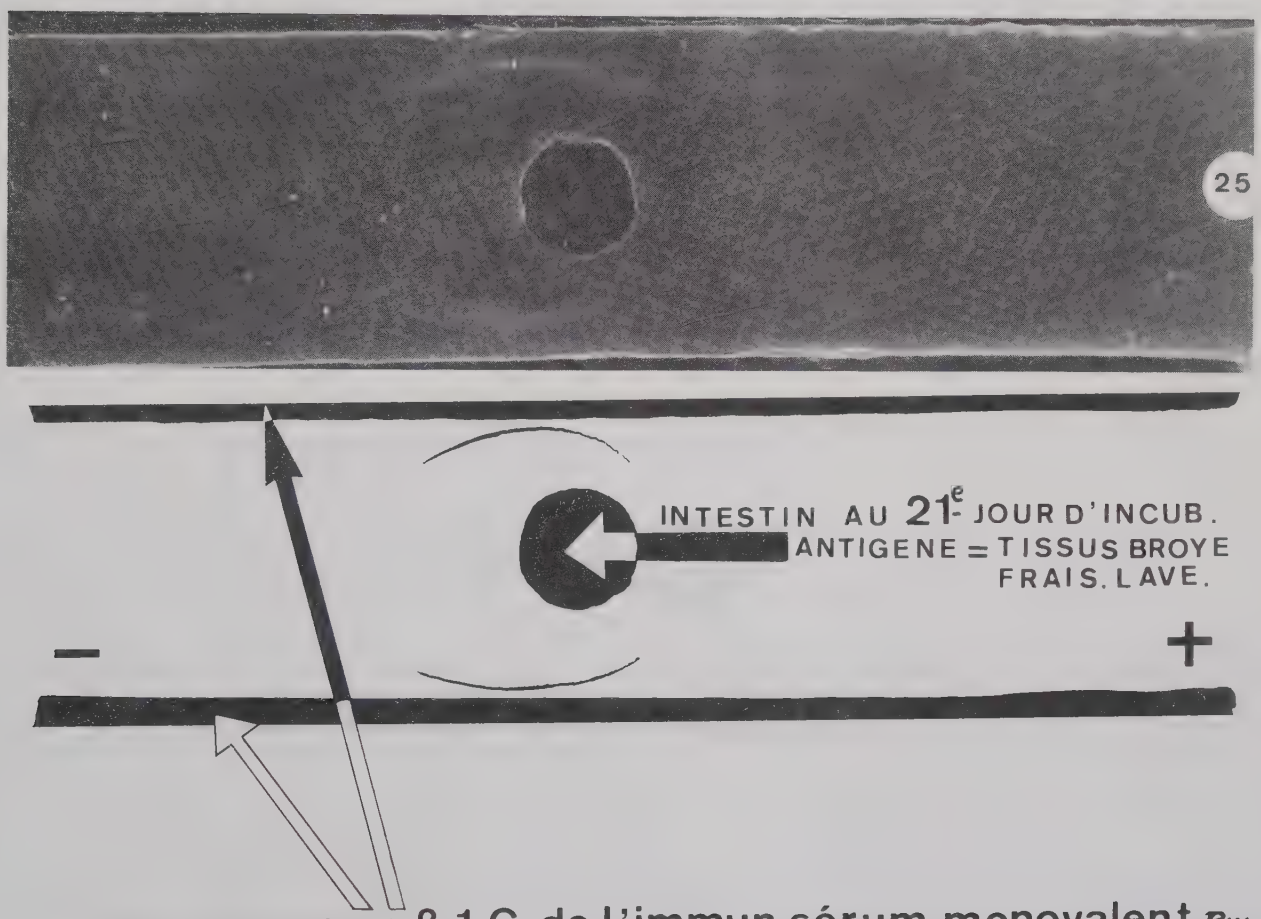
Le tissu étant frais et l'immun-sérum étant bien monovalent (Voir vérifications précédentes) on peut envisager la présence de Beta-1-C dans l'intestin de poulet à l'éclosion (Figure n°28, lame 25).

Cette éventualité nous a conduit à vérifier la présence de Beta-1-C au niveau de l'intestin de poulet à l'éclosion par la technique d'immunofluorescence, avec le même immun-sérum, marqué cette fois à l'isothiocyanate de fluoresceine ___

Il existe donc une parenté antigénique entre Beta-1-C de poulet, et Beta-1-C humaine. Cette fois il peut s'agir de Beta-1-C- tissulaire de poulet, révélée par de l'anti-Beta-1-C sérique humaine. En effet : le broyat étant lavé à l'eau physiologique il ne reste pas beaucoup de sang dans le tissu sur lequel on pratique l'électrophorèse.

FIG. N°28

Identification de ß1C sur intestin de poulet à l'éclosion



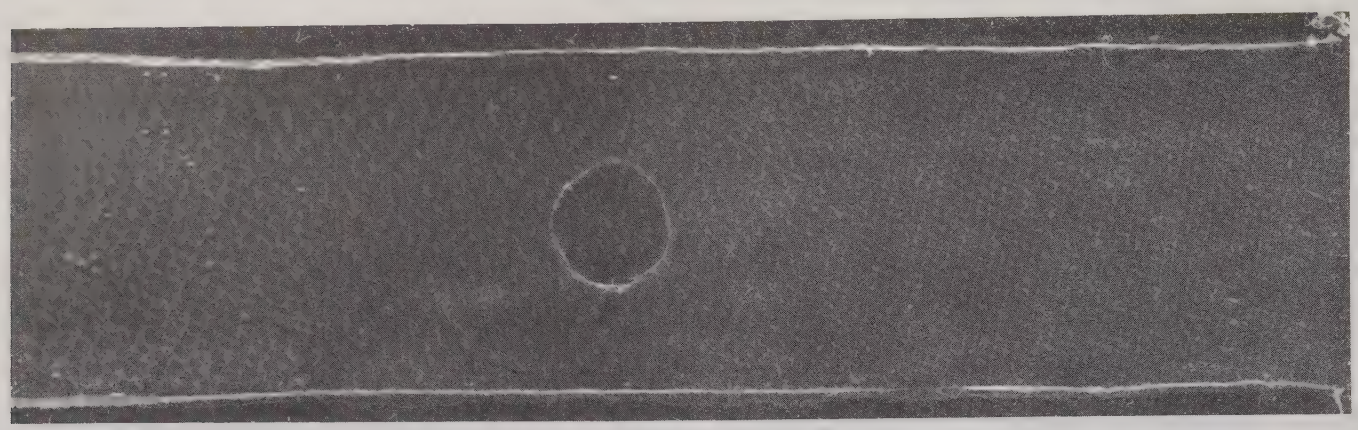
conclusion:

Parenté antigenique entre ß1C humaine et ß1C de poulet: cette fois il s'agit de ß1C tissulaire de poulet, révélée par de l'anti-ß1C sérique humaine.

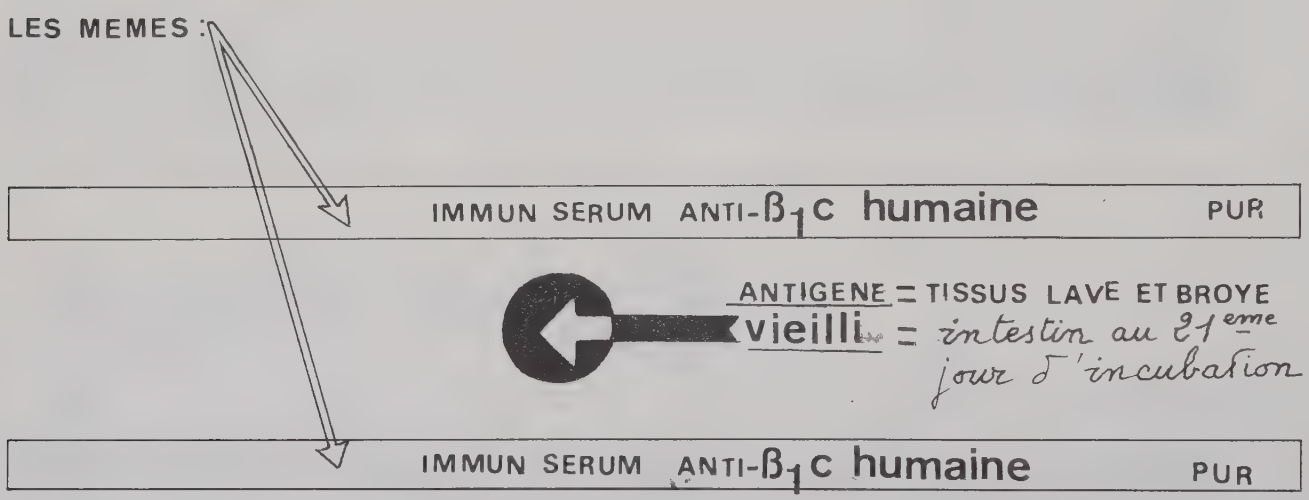
→ d'où possibilité d'utiliser l'immun sérum de chèvre anti ß1C humaine pour rechercher sur coupes à la congélation la première formation de ß1C in situ chez l'embryon de poulet...

FIG N°28 BIS

DISPARITION DE L ARC DE PRECIPITATION IMMUNOELECTROPHORETIQUE OBTENU SUR BROYAT D'INTESTIN FRAIS, (FIG. N° 28) SI ....



... CE BROYAT EST VIEILLI, TOUTES AUTRES CONDITIONS RESTANT LES MEMES :



Nous n'avons pas pu identifier la globuline Bêta-1-C sur broyats ou tissus frais des organes de poulet suivants, (toutes autres conditions restant les mêmes que pour l'identification immunoélectrophorétique de Bêta-1-C sur l'intestin) (Fig. N° 31).

FIG N° 31

LES TISSUS FRAIS, BROYATS, SURNAGEANTS DES ORGANES DE POULET CI—DESSUS SONT SOUMIS A L'ELECTROPHORESE PREPARATIVE.

L'IMMUNOELECTROPHORESE CONTRE UN ANTI-SERUM DE LAPIN ANTI-SERUM FRAIS DE POULET RESTE NEGATIVE: PAS D'ARC ANTI-β-1-C — β-1-C

L'IMMUNOELECTROPHORESE CONTRE L'IMMUN SERUM MONOVALENT ANTI-β-1-C RESTE NEGATIVE: PAS D'ARC ANTI-β-1-C — β-1-C.

ET CE, QUEL QUE SOIT LE STADE DU DEVELOPPEMENT.

NOTE TECHNIQUE :

LES EPREUVES PAPIER NOIR ET BLANC CI-DESSUS ONT ETE OBTENUES EN PROJECTION CONTACT DIRECT. LES LAMES SONT PLACEES CONTRE LE PAPIER SENSIBLE, LE FILM DE GELOSE CONTRE LA SURFACE DU PAPIER (NETTETE—IMAGES GRANDEUR).

Après obtention de résultats positifs en immunofluorescence, recherche d'une confirmation par la technique d'immuno-électrophorèse sur tissus frais de thymus et de bourse de Fabricius. Confirmation de parenté antigénique entre thymus et bourse de Fabricius. (Fig. N° 32).

Les résultats dégagés des immuno-électrophorèses suivantes sont d'un très grand intérêt (photos page 175) :

- le broyat de thymus de poulet, en réaction avec l'anti-thymus ou anti-bourse de Fabricius, d'une part,

- la bourse de Fabricius, en réaction avec l'anti-bourse de Fabricius ou anti-thymus, d'autre part,

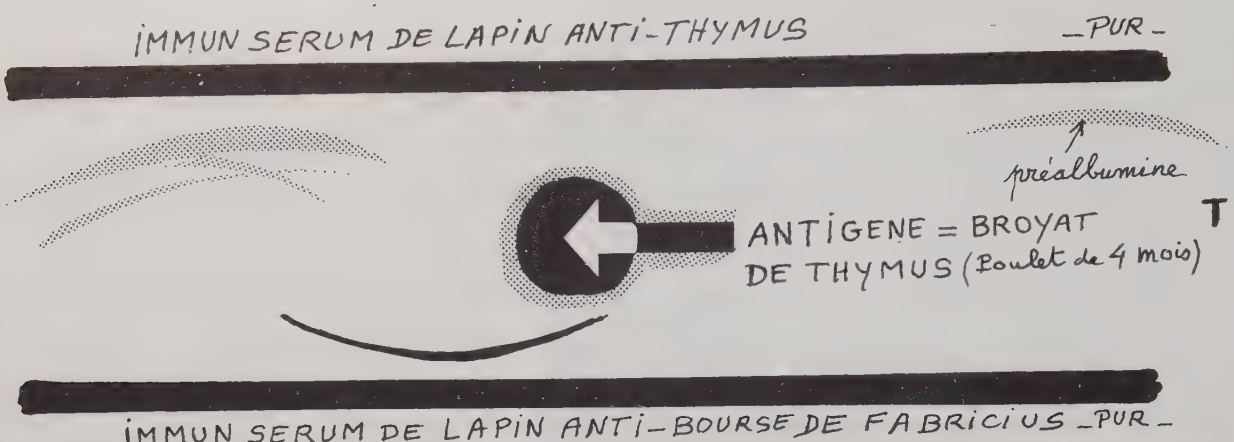
présentent en effet des précipitations croisées :

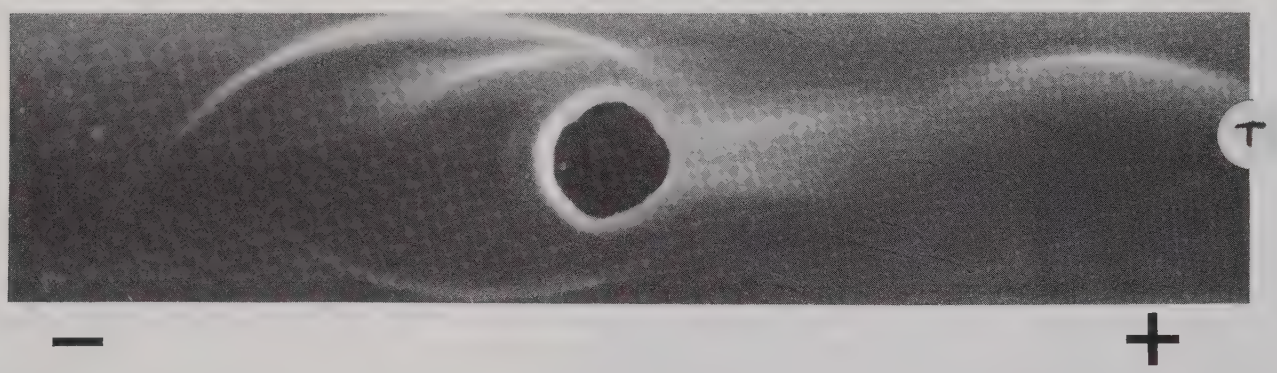
Il y a donc parenté immunologique entre ces deux organes.

Nous déterminerons ultérieurement l'antigène commun et l'antigène différent qui se trouvent dans ces organes.

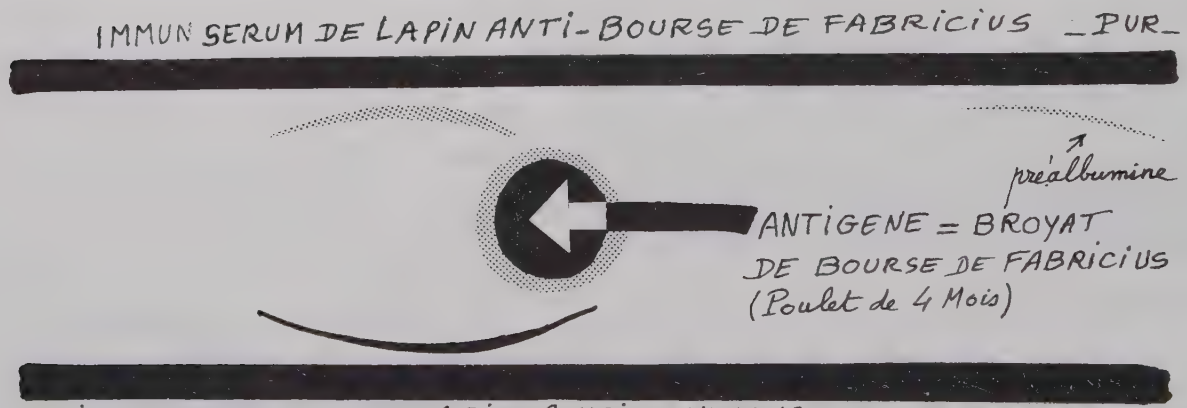
FIG N: 32

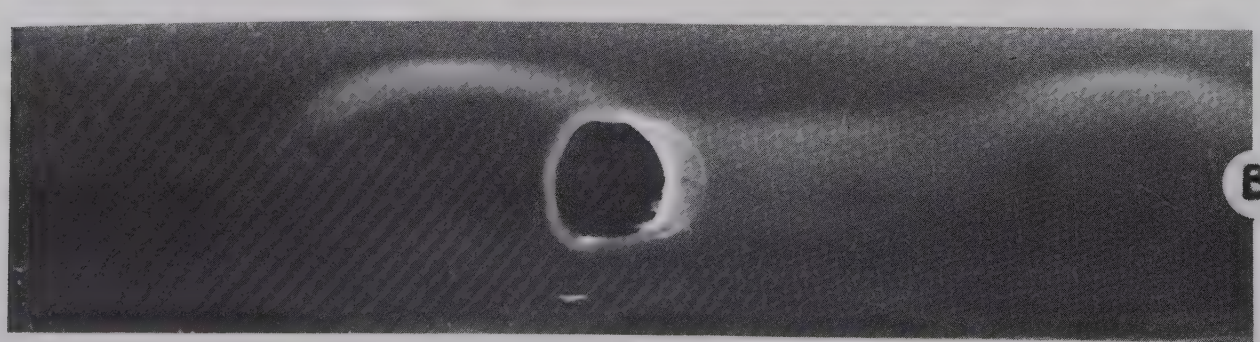
CONFIRMATION DE PARENTE ANTIGENIQUE ENTRE THYMUS . . .





. . . ET BOURSE DE FABRICIUS





RESULTATS EXPERIMENTAUX

III - CARACTERISATION DE LA FRACTION BETA-1-C SUR COUPES A CONGELATION d'INTESTIN d'EMBRYON DE POULET EN IMMONUFLUORESCENCE.

Les coupes sériées à congélation faites sur embryons de poulet à différents stades d'incubation et in toto, ont montré, après traitement avec de l'anti-Bêta-1-C fluorescent :

1) la présence de Bêta-1-C dans le chorion
2) et quelques fois dans la couche muqueuse et l'épithélium.

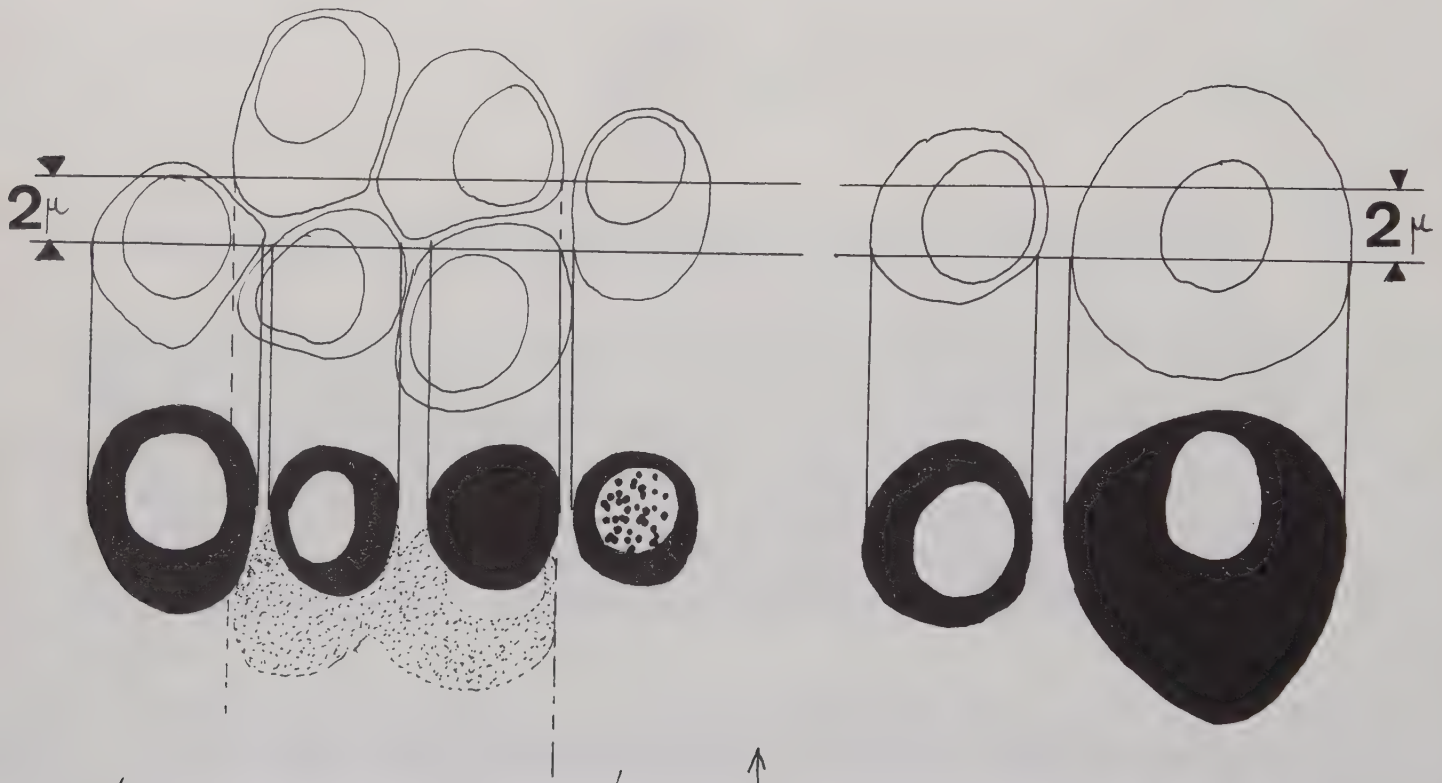
La Bêta-1-C est bien intracellulaire : les taches fluorescentes présentent des contours nets et leur taille correspond à celle des cellules avoisinantes.

Comme toutes les coupes sont faites à 2µ, nous sommes en droit d'affirmer qu'il ne peut s'agir des souillures de Bêta-1-C extra-cellulaires (voir Fig. n° 12).

FIG N° 12

de l'intérêt d'effectuer les coupes à 2 µ

Dans les cas les plus défavorables ---------- Comme dans les cas les plus favorables,



des coupes effectuées à 2 µ d'épaisseur permettent de différencier un noyau non fluorescent (négatif) d'un cytoplasme fluorescent (actif, positif)...

On ne peut en dire autant de coupes épaisses (>2 µ), lesquelles ne permettraient pas de différencier une fluorescence cytoplasmique ou nucléaire d'une fluorescence membranaire

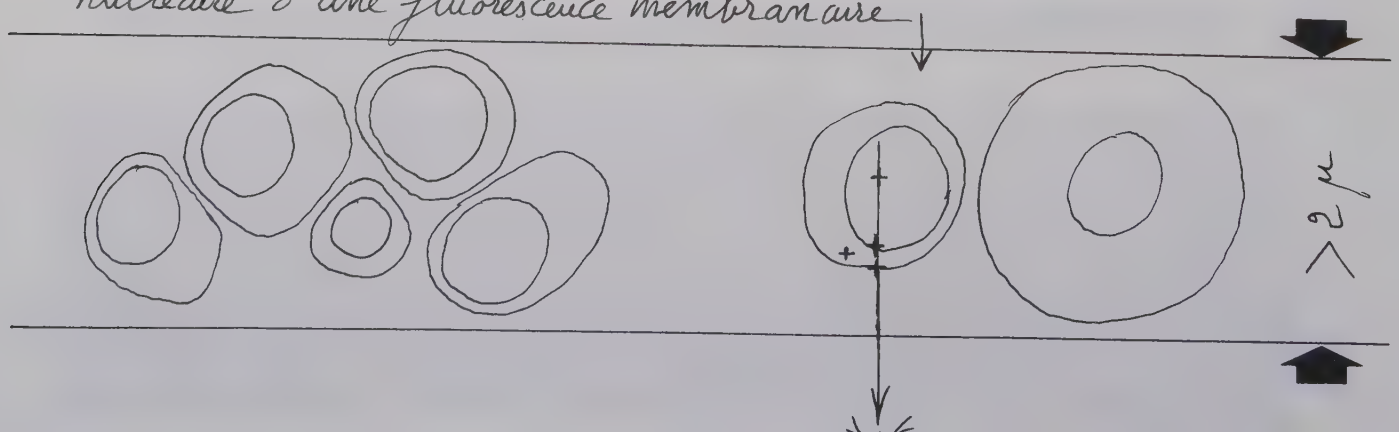


FIG. N° 36

IMMUNO FLUORESCENCE DIRECTE:

LOCALISATION, IDENTIFICATION ET DENSITÉ DES POPULATIONS CELLULAIRES QUI, LES PREMIÈRES, SECRETENT LA BETA-1-C$_1$ EN FONCTION DE L'AGE ET DES ORGANES CHEZ LES QUELS ELLES FLUORESCENT.

1 — Recherche du stade d'incubation correspondant à la toute première formation de Beta-1-C globuline. Immuno fluorescence directe sur embryons coupés in toto.

5 — Identification du Locus de première formation

8 — BOURSE DE FABRICIUS$^+$; INTESTIN$^+$

10 — IDENTIFICATION DU LOCUS DE 2ème FORMATION

11 — THYMUS +++

12

17

21 — E

15 30 45 60 75 90 105 120 — THYMUS — BOURSE DE FABRICIUS — MESURE DE LA DENSITÉ DE POPULATION β-1-C$^+$

+++

Les deux chapelets de lobes thymiques

= THYMUS

GALLUS_GALLUS_LEGHORN.SYKES.H3

ESTOMAC

V.

FOIE

RATE

PANCREAS

ANSE DUODENALE

GRÊLE

CŒCA DROIT

CŒCA GAUCHE

++

BOURSE DE FABRICIUS

INTESTIN TERMINAL

+

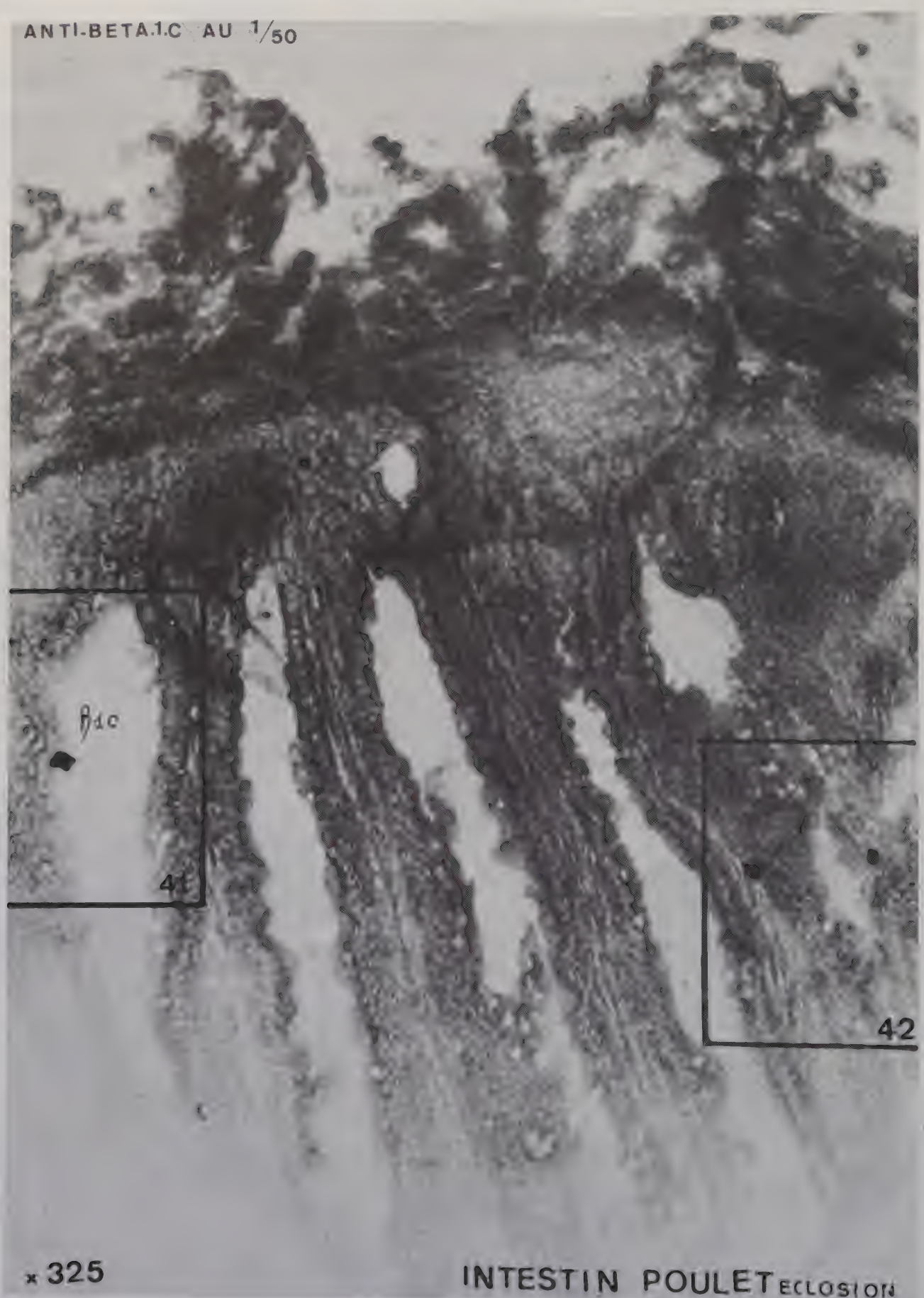
R

Cod

URd

PRd

COUPE SAGITTALE MED.



× 325 INTESTIN POULET ECLOSION

INTESTIN POULET ECLOSION
BETA_1_C
×3250
41

INTESTIN POULET ECLOSION
×3250
42

RESULTATS EXPERIMENTAUX

IV - IDENTIFICATION EN IMMUNOFLUORESCENCE DE LA PREMIERE FORMATION IN SITU DE LA FRACTION BETA-1-C :

Les éléments secréteurs de la Bêta-1-C sont repérés par incubation avec de l'anti-Bêta-1-C fluorescent.

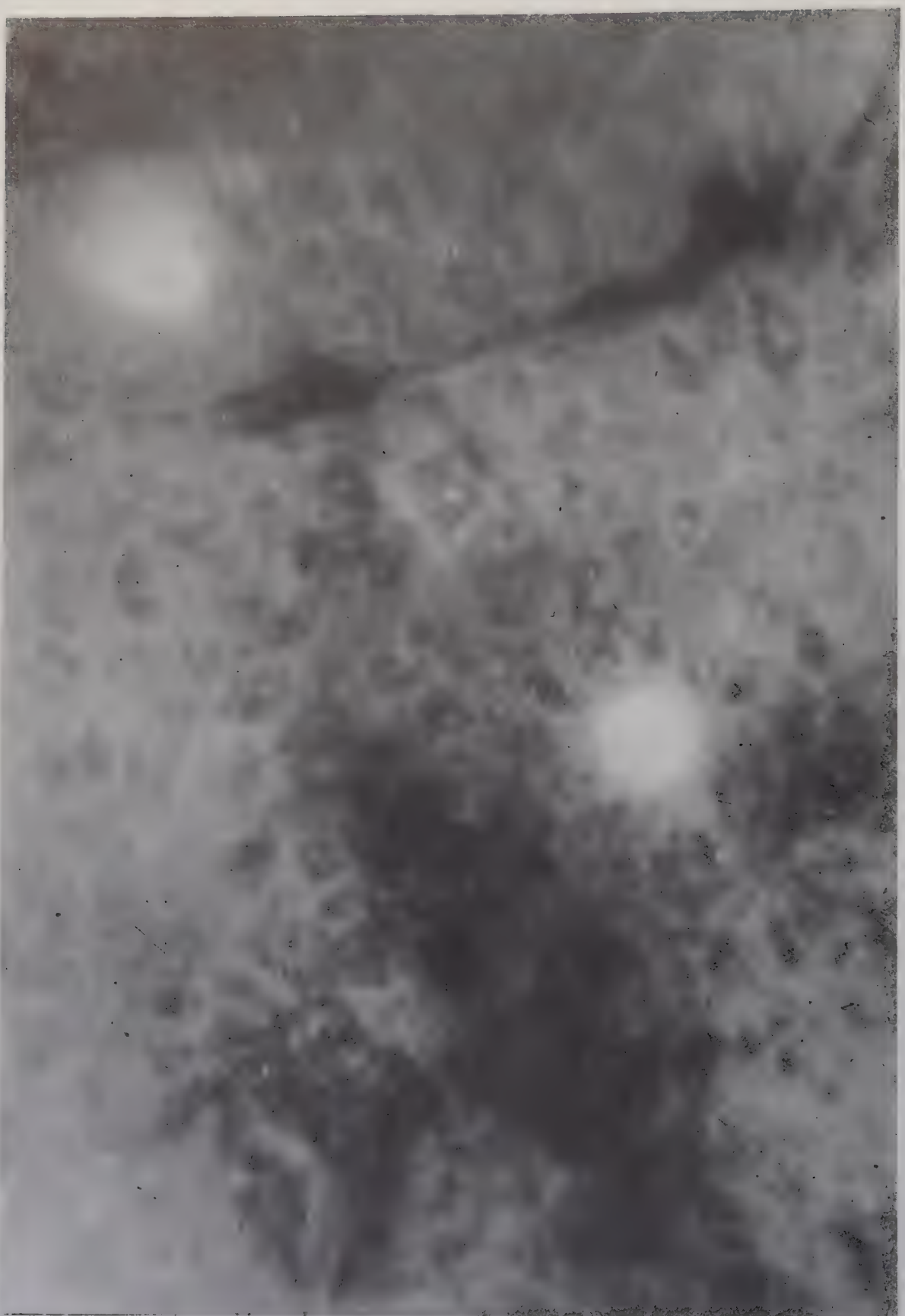
Les éléments existent dans la Bourse de Fabricius et dans le Thymus.

Leur taille est de l'ordre de 15 μ de diamètre, arrondis, avec un noyau central.

Leur protoplasme est basophile, éte,du, assez clair, ou plus étroit et plus foncé. La basophilie est uniforme, soit répartie par places et à la périphérie où elle prend une coloration bleu intense; parfois marqué d'excroissances. Il reste clair au pourtour du noyau.

Leur noyau est volumineux, rougeâtre, à chromatine finement réticulée, presque pointillée, mais trsè fragile; cette chromatine se condense par instants. Dans ce noyau : présence constante de 2 ou 3 nucléoles.

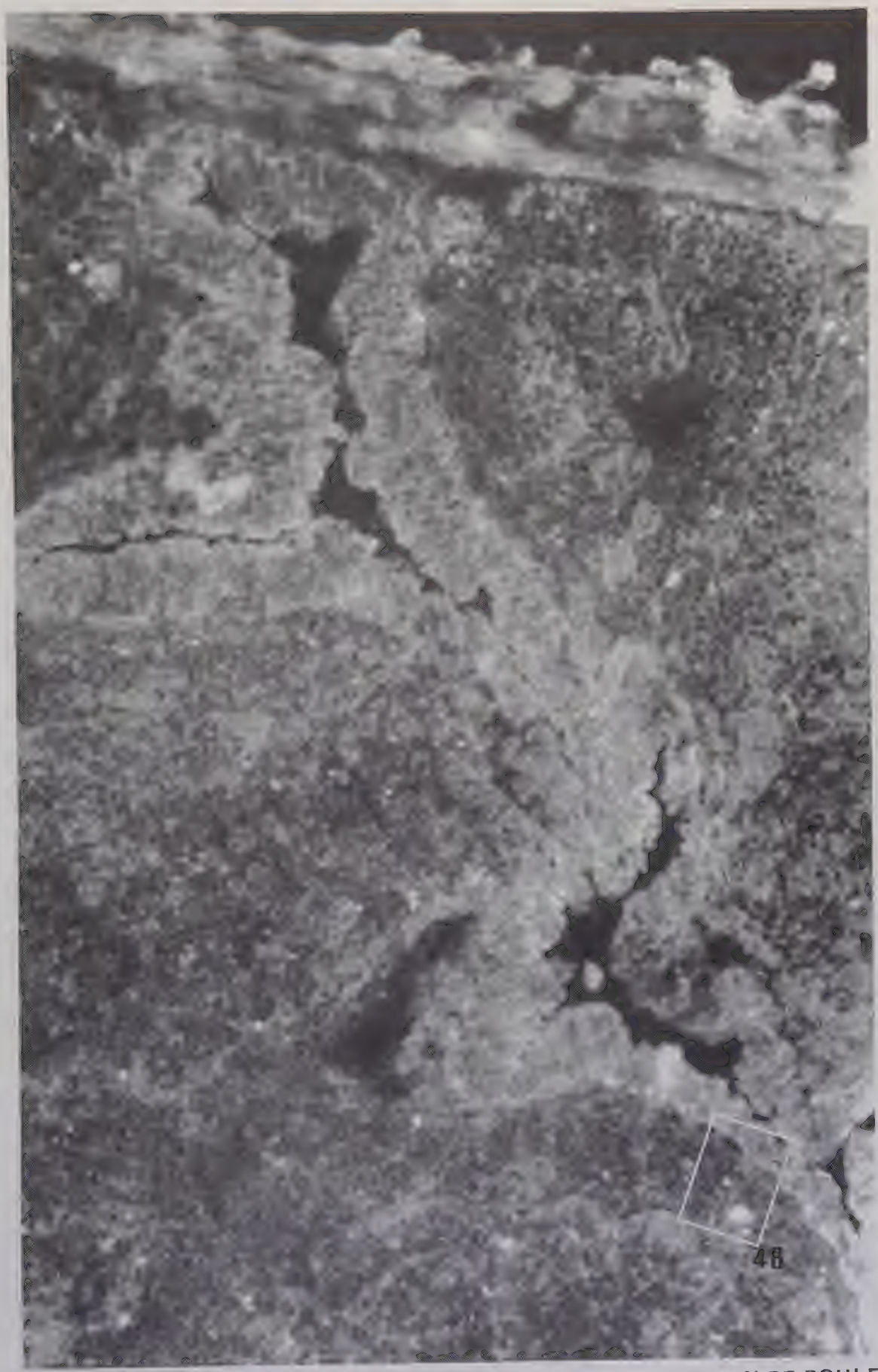
Il s'agit de toute évidence de lymphoblastes caractéristiques des lignées lymphoblastiques du tissu lymphoïde.



IDENTIFICATION EN IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE DE LA PREMIERE FORMATION IN SITU DE LA GLOBULINE BETA 1 C CHEZ L'EMBRYON DE POULET → 12e JOUR D'INCUBATION.

× 3250

BOURSE DE FABRICIUS (EBAUCHE LYMPHOIDE) JOLLY 1915.
PREMIERE EBAUCHE FOLLICULAIRE (



× 325

BOURSE DE FABRIÇIUS EMBRYON DE POULET
20ème JOUR D'INCUBATION (Voir cellule β-1-C+ page

× 3250

CELLULE BETA.1.C-POSITIVE DU CORTEX FOLLICULAIRE FABRICIEN.
20ème JOUR D'INCUBATION.

BOURSE DE FABRICIUS DE POULET A L'ECLOSION
:APPARITION DE BETA.1.C PLASMATIQUE ET DE CEL
LULES BETA.1.C-POSITIVES PERI FOLLICULAIRES

×325

× 325

BOURSE DE FABRICIUS POULET DE 4 MOIS
VOIR FIG.10+TABL.4 & FIG.37

×3250

CELLULE BETA.1.C-POSITIVE DE LA MEDULLAIRE FABRICIENNE (BOURSE DE 4 MOIS).

PHOT 52

CELLULES ET PLASMA BETA.1.C POSITIFS DANS CORTEX FABRICIEN. C

(VASCULARISATION PERI-FOLLICULAIRE

on peut attribuer la résultante orangée de la teinte de fluorescence à la présence d'érythrocytes dans le plasma positif.

VOIR PHOT 53

UNE BASALE DE 100 mμ SEPARE LE CORTEX VASCULARISE ET INNERVE, DE LA MEDULLAIRE AVASCULAIRE & PRIVEE DE NERF (ARVY.L) C M

x 325

BOURSE DE FABRICIUS (POULET DE 4 MOIS A MATURITE

× 3250

BETA.1.C PLASMATIQUE (Vascularisation intra corticale).

×3250

BOURSE DE FABRICIUS POULET DE 4 MOIS
CELLULE BETA.1. C-POSITIVE DE LA MEDULLAIRE

× 3250

THYMUS DE POULET EMBRYON DE 17 JOURS D'INCUBATION Première apparition de β-1-C dans cet organe.

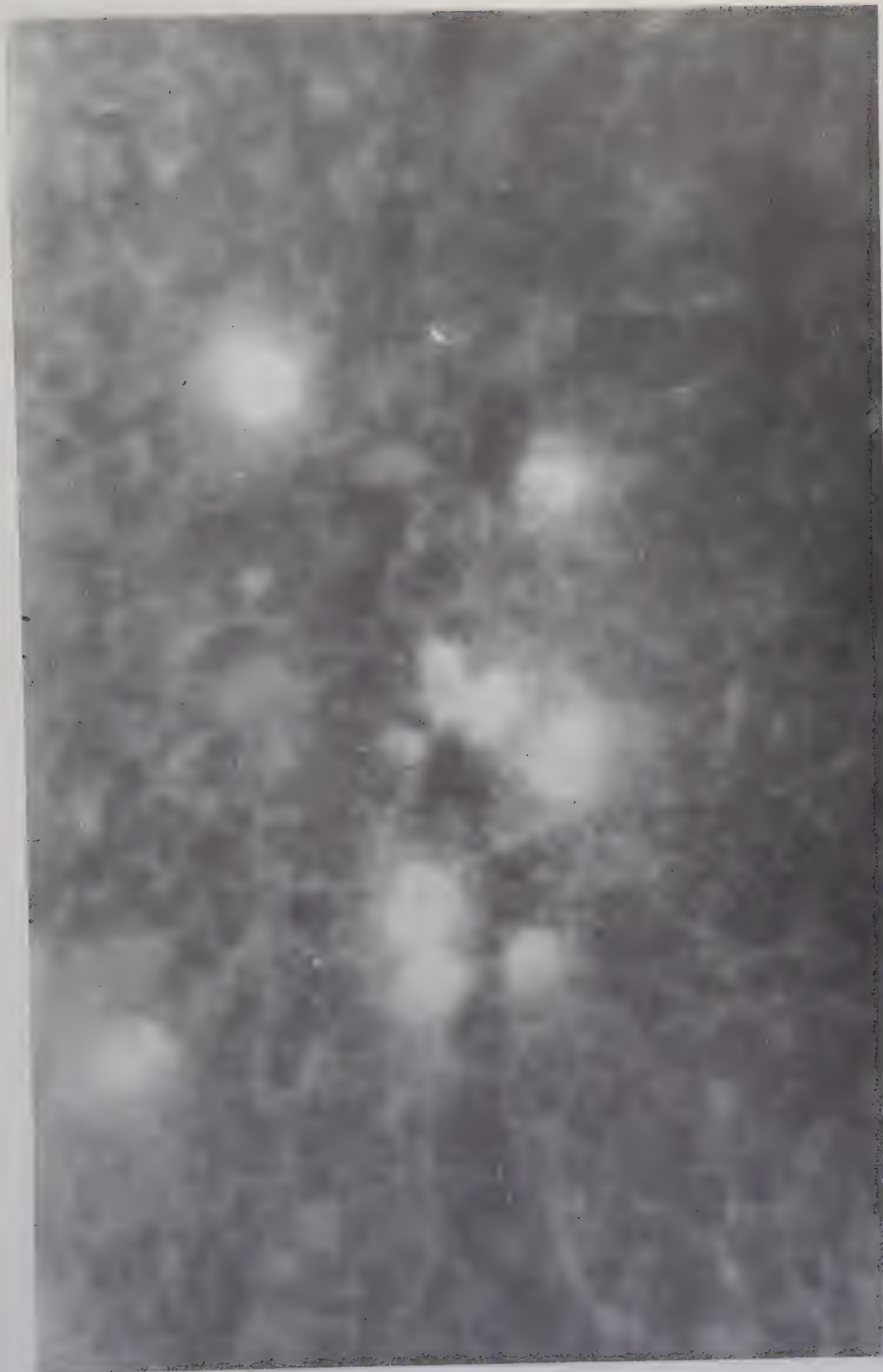
× 325

THYMUS DE POULET A 18 JOURS D'INCUBATION
ILOTS DE CELLULES BETA.1.C-POSITIVES

THYMUS DE POULET A L'ECLOSION : DEJA LE NOMBRE DE CELLULES BETA.1-C^{+} A BEAUCOUP

×3250

THYMUS DE POULET A L'ECLOSION
CELLULE BETA.1.C-POSITIVE



×1300

THYMUS DE POULET A 1 MOIS
CELLULES BETA.1.C-POSITIVES

×3250

THYMUS DE POULE DE 2 MOIS
CELLULES BETA-1 C-POSITIVES →

× 3250

THYMUS DE POULET DE 2 MOIS
CELLULE BETA.1 Ç-POSITIVE

× 325 THYMUS DE POULET A 4 MOIS (ESSAIMS+)

× 3250 THYMUS POULET DE 4 MOIS | CELLULE BETA 1 C+ EN MITOSE

RESULTATS EXPERIMENTAUX

V - NEGATIVATION DE LA FLUORESCENCE SPECIFIQUE :

Pour étudier les motifs antigéniques de la Bêta-1-C, nous utilisons la technique de négativation de fluorescence spécifique, après avoir traité les coupes à congélation de Thymus et de Bourse de Fabricius :

- avec de l'hydrazine,
- avec du sérum anti-thymus,
- avec du sérum anti-Bourse de Fabricius,
- avec du sérum anti-Ig de Poule.

A) NEGATIVATION AVEC DE L'HYDRAZINE

- DES TRAVAUX ANTECEDENTS, ON TIENT POUR ACQUIS :

1 - qu'un antigène possède plusieurs "motifs" ou déterminants antigéniques.

2 - que la Bêta-1-C globuline possède les motifs A, B et D de West, Davis et Forristal (West. C.D.-1966).

Ces auteurs ont montré notamment :

$$\beta 1\ C_{A,B,D} \xrightarrow{\text{au cours du vieillissement}} \beta 1A_{A} + \alpha_2 D_{D+D_d}$$

$$\beta 1\ C_{A,B,D_{\text{motif B}}} \xrightarrow{\text{l'hydrazine détruit le}} \beta 1A_{A} + \alpha_2 D_{D+Dd}$$

3 - que le motif Dd se trouve sur l'α_2 D mais ne se trouve pas sur la β 1C : le motif Dd se trouverait masqué dans la β 1C native.

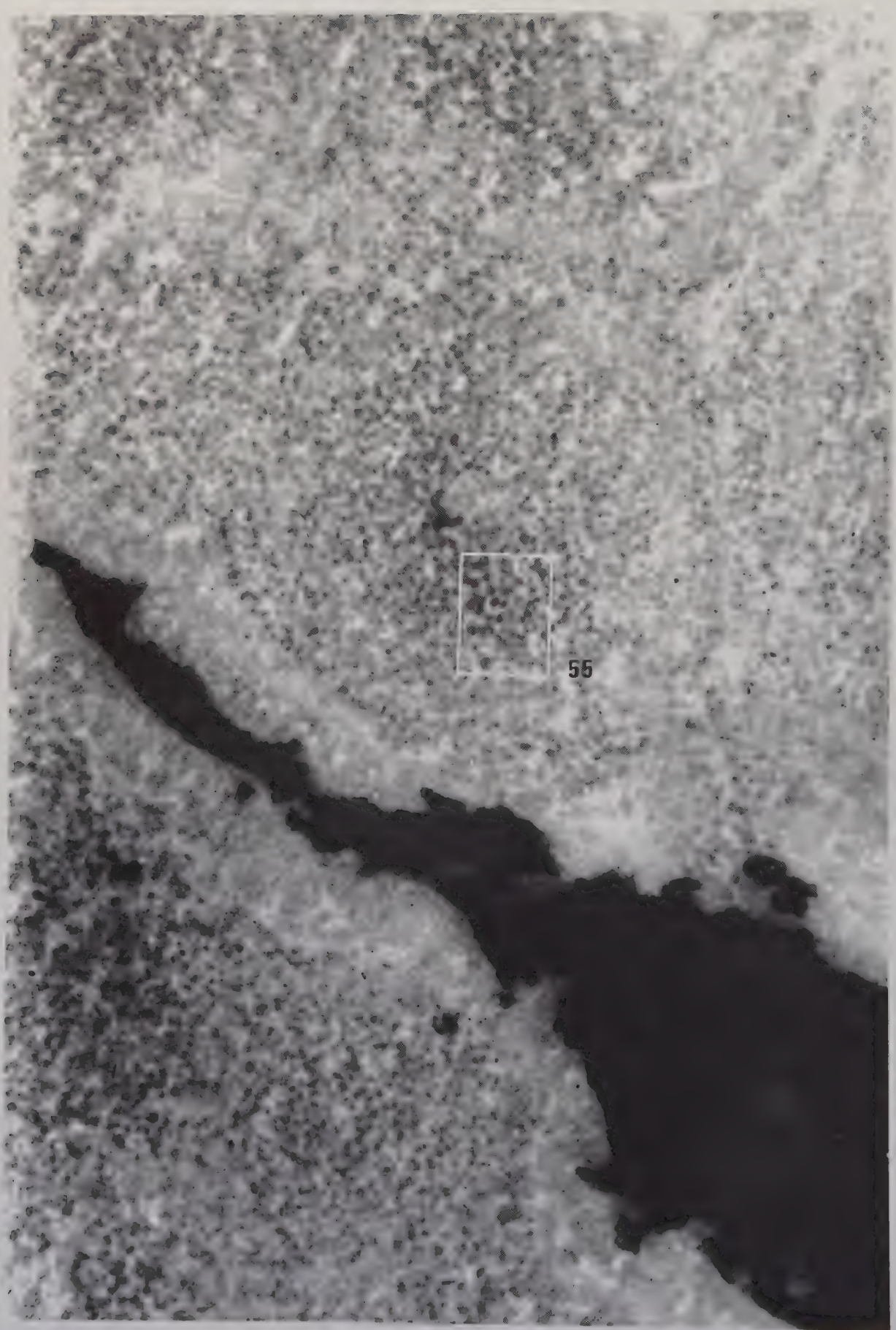
- DE NOS PROPRES RESULTATS EXPERIMENTAUX DE NEGATIVATION DE LA FLUORESCENCE SPECIFIQUE (traitement préalable à l'hydrazine des organes à couper- Fig. N° 35), NOUS DEDUISONS QUE :

L'immunsérum anti-Bêta-1-C possède au moins les motifs anticorps anti-B : en effet, l'extinction de la fluorescence spécifique par l'hydrazine, indique que la fluorescence observée in situ sur les coupes d'organes témoins est dûe aux motifs B.

Conclusion : La Bêta-1-C humaine (sérique) et la Bêta-1-C de poulet (native) ont en commun le motif B.

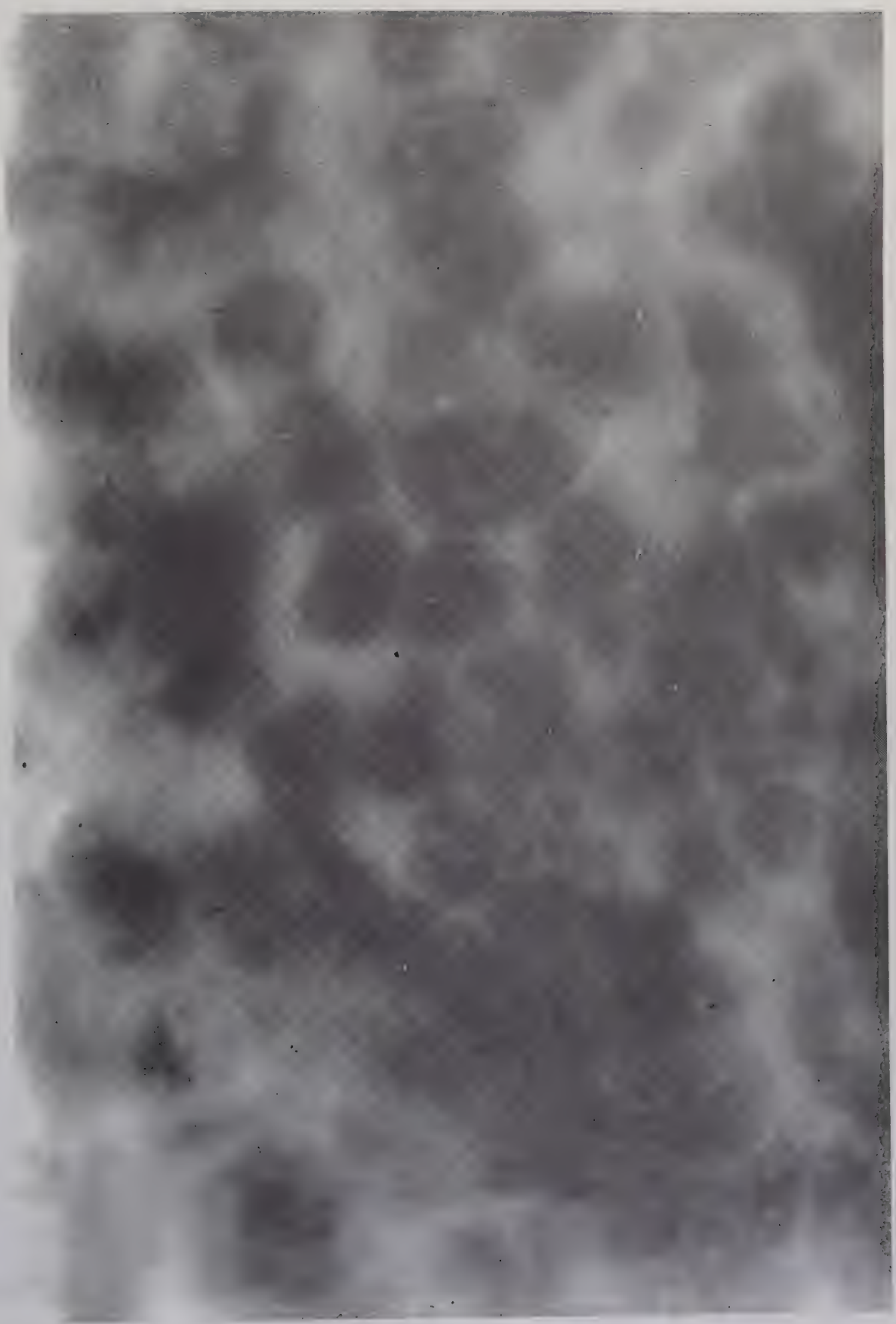
× 325

BOURSE DE FABRICIUS DE 20 JOURS D'INCUBATION
INCUBEE AVEC HYDRAZINE VOIR FIG 35



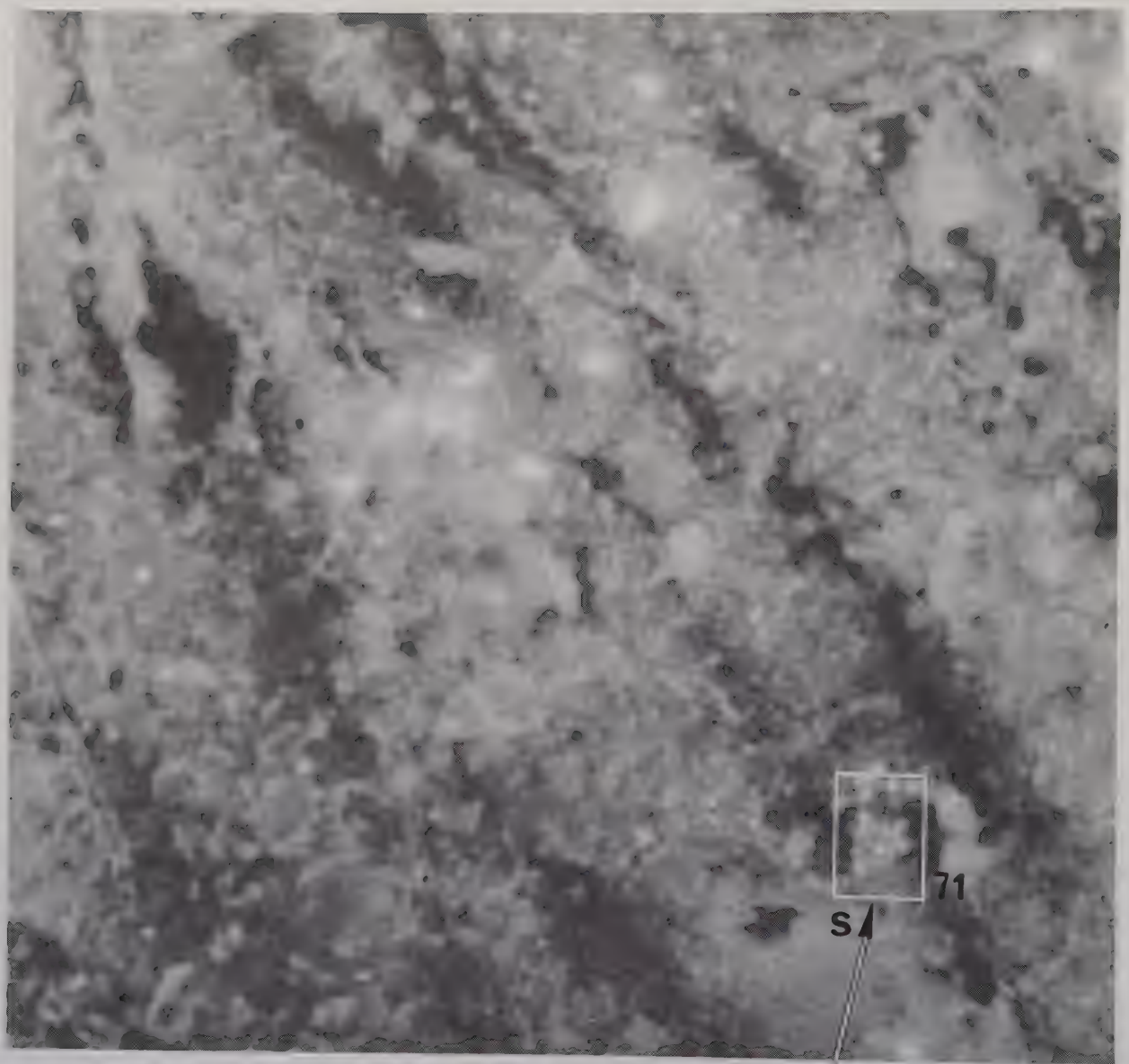
× 325

BOURSE DE FABRICIUS (ICI STADE ECLOSION)
COUPE SATUREE A L'IMMUN-SERUM ANTI-THY[illegible]



× 3250

. . . L'IMMUN SERUM ANTI-BETA 1 C CONJUGUE NE REVELE PLUS LA GLOBULINE IN SITU



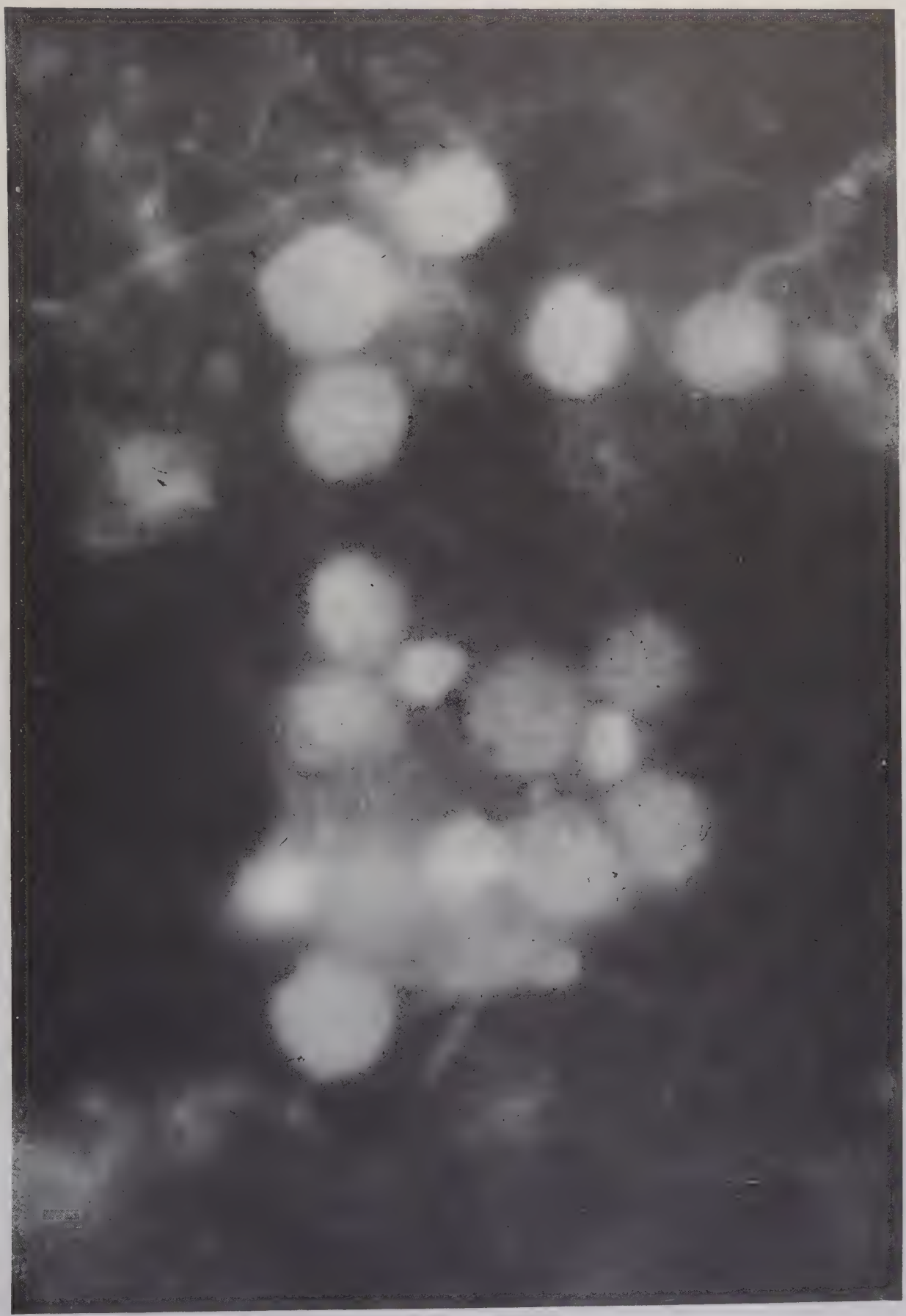
X 325

SATURATION DE CERTAINES LIGNEES CELLULAIRES DU THYMUS PAR NOTRE IMMUN SERUM ANTI-BOURSE DE FABRICIUS AU 1/16 [1]

EMBRYON DE POULET
20 JOURS D'INCUBATION

+ANTI BETA 1 C AU 1/50 [2]

(VOIR DETAIL (X 3250 PHOT 71 SUR PAGE SUIVANTE → 71



x 3250

TOUS LES SITES BETA1.C NE SONT PAS SATURES . . .
THYMUS NEGATIVATION

RESULTATS EXPERIMENTAUX

VI - COMPARAISON DES CINETIQUES DE FORMATION DE BETA-1-C GLOBULINE PAR MESURE DE LA DENSITE DE POPULATION CELLULAIRE BETA-1-C FORMATRICE DANS LE THYMUS ET DANS LA BOUSE DE FABRICIUS:

Les populations lymphoblastiques Bêta-1-C formatrices (Thymus et Bourse de Fabricius) sont comptées depuis leur apparition jusqu'à l'éclosion, puis ensuite jusqu'à la maturité sexuelle où ces deux organes lympho-épithéliaux "centraux" commencent leur involution.

Les densités des cellules Bêta-1-C immunofluorescentes sont notées dans les pages suivantes (Pages 208 à 211).

Les graphiques correspondantes à ces comptages apportent les conclusions suivantes (Page 212) :

1) pour le Thymus :
   - apparition des lymphoblastes Bêta-1-C formaterus au 17è jour d'incubation,
   - ils augmentent très rapidement du 17è jour au 21è jour où la population devient 4 fois celle du 21èjour;
   - à la fin du 1er mois, elle devient 8 fois celle du 21è jour
     du 2è mois, 10 fois
     du 3è mois, 13 fois
     du 4è mois, 18 fois

2) pour la Bourse de Fabricius :
   - appariton des lymphoblastes Bêta-1-C formaterus au 12è jour d'incubation,
   - leur nombre augmente rapidement du 12è jour au 51è jour, où la population devient 4 fois celle du 21è jour,
   - puis lentement du 51è jour au 141è jour, où la population devient 5 fois la population du 21è jour.

RESULTATS EXPERIMENTAUX : TABLEAU N° **1** (T1.17.1.3)
MESURE DE LA DENSITE **dm** DE POPULATION CELLULAIRE BETA-1-C POSITIVE AU NIVEAU D'UNE SEULE COUPE : exemple extrait des calculs concernant un thymus de poulet (embryon de 17 jours d'incubation).

N°d'ordre des champs positifs (cadreur 24x36 S = 0,3 mm2) * Voir 3ème coupe Tableau n° **2**	Valeur de **n** calculées (comptage des cellules fluorescentes)	Calcul de **d** pour chaque champ de 03 mm2 $d = \frac{n}{s}$	Calcul de **dm** $dm = \frac{d1+d2+d3+d4}{4}$ (4 champs trouvés
1er champ	3 ou 4 "cellules +"	$d_1 = \frac{3,5}{0,3} = 11,7$	
2ème	3 ou 4"cellules +"	$d_2 = \frac{3,5}{0,3} = 11,7$	
3ème	4	$d_3 = \frac{4}{0,3} = 13,3$	
4ème	4	$d_4 = \frac{4}{0,3} = 13,3$	

4 = SOMME DES CHAMPS TROUVES POSITIFS

ET SOMME DES VALEURS DE **d** = → **50**

$dm = \frac{50}{4}$

12,5

Signification de "T1.17.1.3"

- Thymus n°1 (2 animaux par stade étudié)
- STADE D'INCUBATION
- N° du lobe thymique
- N° de la coupe

pour le seul stade 17: 20 coupes par lobe thymique.
pour les autres stades : 2 coupes seulement par lobe thymique.

RESULTATS EXPERIMENTAUX : TABLEAU N° 2 (T1.17.1.)
MESURE DE LA DENSITE dm 20 DE POPULATION CELLULAIRE BETA-1-C POSITIVE AU NIVEAU D'UN SEUL LOBE THYMIQUE : EXEMPLE EXTRAIT DES CALCULS CONCERNANT UN THYMUS DE POULET (EMBRYON DE 17 JOURS D'INCUBATION).

N° d'ordre des 20 coupes effectuées dans la région centrale d'un seul lobe thymique (le 1er des 19 lobes du thymus) Voir Tableau N° 3 **	Valeurs de dm calculées Voir Tableau N° 1 concernant la coupe n° 3 *
Coupe n° 1	11,5
- n° 2	10,9
→ - n° 3	→ 12,5
- n° 4	13,2
- n° 5	13,4
- n° 6	11
- n° 7	14
- n° 8	11,9
- n° 9	10,8
- n° 10	13,1
- n° 11	11,4
- n° 12	11,8
- n° 13	13
- n° 14	10,6
- n° 15	12,1
- n° 16	12,7
- n° 17	10
- n° 18	12,2
- n° 19	11,3
- n° 20	12,5

CALCUL DE dm_{20}

$$dm_{20} = \frac{\text{SOMME DES } dm}{\text{NOMBRE DE COUPES}}$$

$$dm\ 20 = \frac{240}{20}$$

dm 20 = 12

** VOIR TABLEAU N° 3

Au stade 17 jours d'incubation, on a pu effectuer par lobe thymique 10 fois plus de coupes qu'aux autres stades étudiés: soit 20 coupes au lieu de 2. Dans ce cas, on a écrit: dm_{20} et pour les autres stades:

$$dm_2 = \frac{\text{Somme des 2 valeurs de dm}}{\text{Nombre de coupes par lobe (2)}}$$

RESULTATS EXPERIMENTAUX : TABLEAU N° 3 (T1.17)
MESURE DE LA DENSITE DT1 DE POPULATION CELLULAIRE BETA-1-C POSITIVE AU NIVEAU D'UN SEUL THYMUS : EXEMPLE EXTRAIT DES CALCULS CONCERNANT L'UN DES DEUX THYMUS DE POULET, SOIT UN SEUL STADE (EMBRYON DE 17 JOURS D'INCUBATION).

N° d'ordre des lobes d'un seul thymus de 17 jours d'incubation Voir Tableau N° 2	Valeurs des dm 20 calculées	CALCUL DE DT_1 (Thymus T 1) DT= Somme des valeurs de d / Nombre de lobes par Th
** → 1	→ 12	$DT_1 = \frac{209}{19}$
2	11,4	
3	9,9	
4	10,3	
5	10,8	
6	11,8	
7	10,1	
8	11,3	
9	9,8	
10	12,1	
11	10,2	
12	11,7	
13	11,9	$DT_1 = 11$
14	10,7	Voir Tableau N° 4
15	12,2	
16	10	
17	10,6	
18	11	
19	11,2	

Total : 19 lobes = 1 Thymus; 209 = somme des valeurs de dm20

RESULTATS EXPERIMENTAUX : TABLEAU N° **4** (Voir graphique page)
CALCUL DES INDICES (DT et DF) DE DENSITE DE POPULATION CELLULAIRE BETA-1-C POSITIVE DANS LE THYMUS ET LA BOURSE DE FABRICIUS A DIFFERENTS STADES DU DEVELOPPEMENT.

	AGE en jours	Thymus 1 DT_1	Thymus 2 DT_2	Moyenne DT	Bourse 1 DF_1	Bourse 2 DF_2	Moyenne DF
I	11	NEGATIF	NEGATIF	/	NEGATIF	NEGATIF	/
N	12	"	"	/	12	3	7,5
C	13	"	"	/	4	8	6
J	14	"	"	/	10	12	11
B	15	"	"	/	22	14	18
A	16	"	"	/	14	16	15
T	17	11	19	15	18	14	16
I	18	21	13	17	15	21	18
O	19	58	48	53	12	20	16
N	20	70	88	79	23	37	30
O-N	21-22	112	104	108	23	29	26
	15-18	160	146	153	69	49	64
s	26-30-34	180	226	203	83	115	99
	45	222	230	226	120	100	110
e	60	273	233	253	106	112	109
	75	305	260	282,5	100	128	114
e	90	321	336	328,5	118	122	120
	105	397	375	386	154	126	140
e	118-120-128	460	442	451	145	137	141

urité sexuelle)

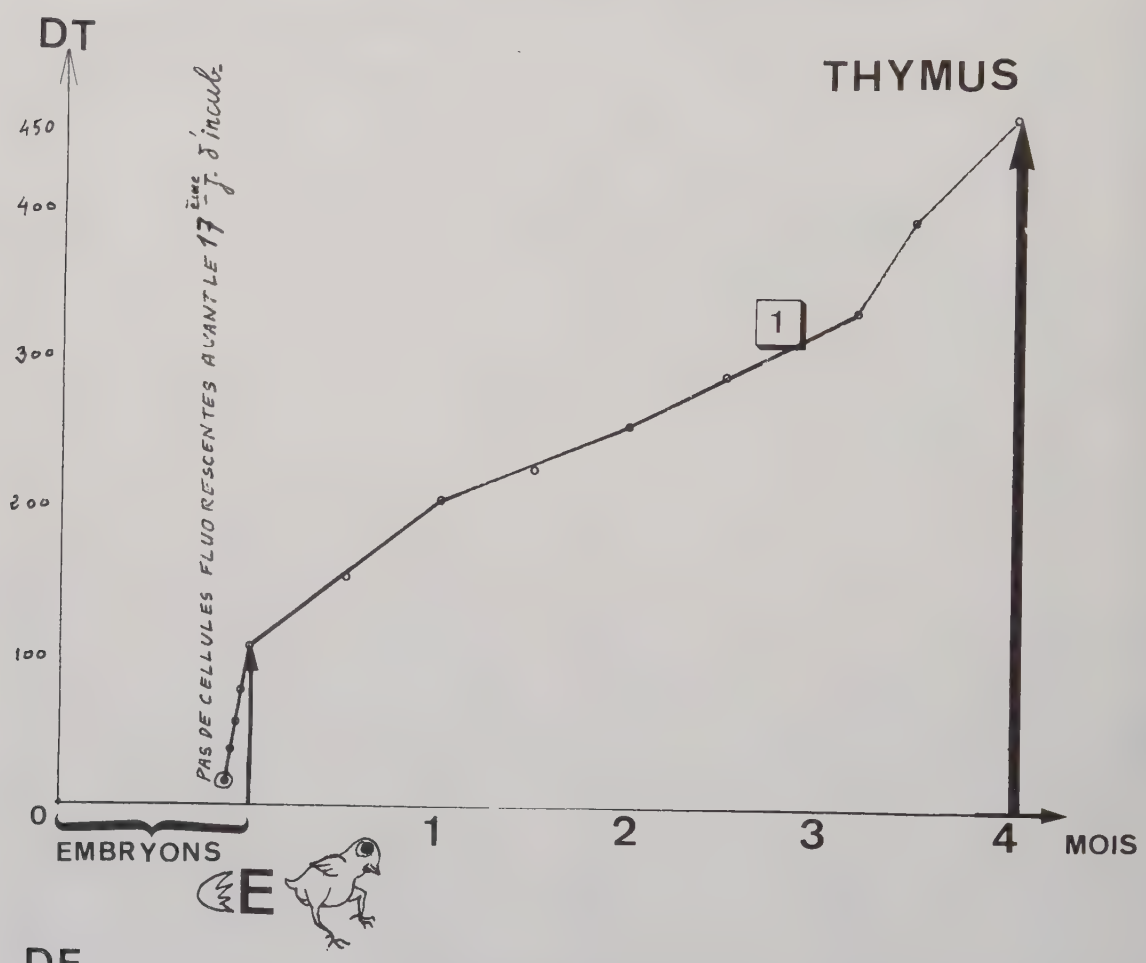
n a finalement obtenu : 13 valeurs de DT et 18 valeurs de DF

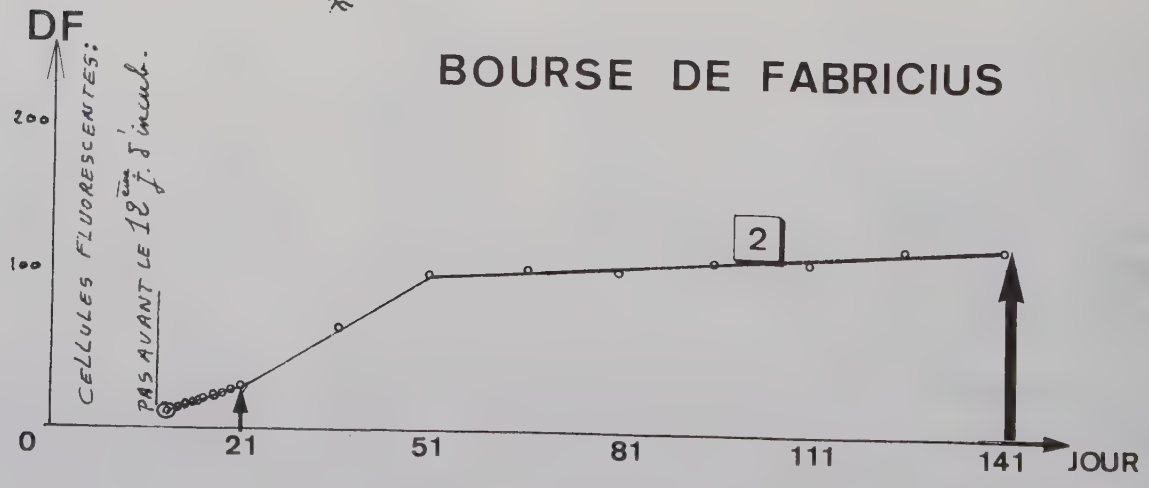
oit .....13 points de coordonnée DT et 18 points de coordonéeDF

ui permettent d'établir les courbes "Thymus" et " Bourse de Fabricius "

FIG. N° 37

DENSITE DE LA POPULATION CELLULAIRE BETA_1_C POSITIVE EN FONCTION DE LA MATURITE DES DEUX ORGANES :





1 THYMUS

2 BOURSE DE FABRICIUS
DIFFERENCIATION MAXIMUM A 4 MOIS

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE

La discussion de nos résultats expérimentaux pourrait être faite en deux chapitres :

1er CHAPITRE

Le premier chapitre concerne :

I) la discussion sur la différence entre spécificité d'espèce et spécificité du "motif Bêta-1-C",

II) la validité de la spécificité immunologique Bêta-1-C dans différentes espèces.

I) DIFFERENCE ENTRE SPECIFICITE D'ESPECE ET SPECIFICITE DU "MOTIF BETA-1-C" :

Les problèmes de spécificité de la fonction "complément" dans une réaction antigène-anticorps, trouvent leur réponse évidente dans la pratique des réactions sérologiques, qui ont rendu depuis toujours d'immenses services en pathologie humaine, et dont l'exactitude et la reproductibilité peuvent être obtenues avec l'utilisation du complément sérique de différentes espèces d'animaux.

Les expériences reproductibles d'immuno-électrophorèse de ce travail prouvent de même, la spécificité de la fraction Bêta-1-C. Cette spécificité est légitimée plus encore, si l'on examine l'évolution de la pratique de la recherche des anticorps incomplets :

- Jadis, on utilisait à cet effet, un sérum antiglobulines pour visualiser le complexe "antigène-anticorps incomplet";
- Actuellement, on pratique en plus deux réactions supplémentaires pour détecter les fausses négativités, en utilisant respectivement :
  . un sérum anti-complément global
  . et un sérum-anti Bêta-1-C

L'utilisation du complément "de cobaye" dans les réactions sérologiques courantes, ou des immun-sérums anti-complément de "cobaye", anti-Bêta-1-C de "cobaye", a été adoptée uniquement pour des raisons de titre élevé; la spécificité d'espèce ne joue en aucune façon.

II - VALIDITE DE LA SPECIFITE BETA-1-C DANS DIFFERENTES ESPECES.

La fraction Bêta-1-C est une protéine sérique. Théoriquement, elle suit les lois d'isotypie (spécificité d'espèce) et d'allotypie (spécificité qui varie d'un animal à un autre). Mais ceci ne gêne en rien dans les expériences d'immuno-électrophorèse ou d'immuno-fluorescence que nous avons exécutées dans ce travail.

Le principe fondamental de ces réactions est uniquement basé sur la fonction antigénique générale de la fraction Bêta-1-C, qui est une famille de molécules protéiques sériques ayant une place bien définie sur le spectre électrophorétique. Le fait qu'elle peut posséder un site antigénique en plus ou en moins (isotype ou allotype) ne gêne en rien dans l'exécution d'une réaction immunologique "antigène-anticorps" avec des protéines sériques ou tissulaires de tout l'embranchement des vertébrés.

2ème CHAPITRE

Le deuxième chapitre concerne :

I. - CONCEPTION ACTUELLE de l'IMMUNITE HUMORALE ET DE l'HYPERSENSIBILITE RETARDEE.

Il existe deux types d'Immunité :

1) L'immunité cellulaire qui comprend l'immunité de greffe et l'hypersensibilité retardée.

L'immunité de greffe est caractérisée par une transformation du petit lymphocyte en cellules immunologiquement compétentes et le rejet de l'homogreffe (peau ou organe provenant d'un sujet de même espèce).

L'hypersensibilité retardée est caractérisée par la même transformation cellulaire et la constitution d'une lésion cutanée apparaissant 48 heures après l'injection sous-cutanée de l'antigène.

Ces deux types d'immunité sont réunis par le fait qu'elles sont liées au petit lymphocyte. La preuve est que :

- il n'existe pas d'anticorps circulants, et cette immunité cellulaire/ne peut être transmise passivement par le plasma d'un sujet sensibilisé à un receveur normal,

- elle peut être, par contre, transmise par transfusion de petits lymphocytes de sujet sensibilisé;

- elle est supprimée par la thymectomie néo-natale chez l'animal, par le sérum anti-lymphocytaire.

2) L'immunité de type humoral est caractérisée par la synthèse d'anticorps dirigés contre un antigène. Ces anticrops sont des immuno-globulines dont il existe trois types principaux : IgG, IgA, IgM. L'immunité humorale peut être transmise de façon

passive par le sérum (principe de la sérothérapie), et non par les lymphocytes. Les anticorps sont secrétés par les plasmocytes.

II - ROLE DES LIGNEES LYMPHOCYTAIRES DANS L'IMMUNITE HUMORALE ET L'HYPERSENSIBILITE RETARDEE

Classiquement on admet que le lymphoblaste (provenant de la cellule réticulaire) donne naissance : au petit lymphocyte, au moyen lymphocyte, au grand lymphocyte. Certains auteurs admettent aussi que les lymphoblastes donnent aussi naissance aux plasmocytes.

Ces cellules immunologiquement compétentes possèdent une différence fondamentale :

- appareil de secrétion très développé sous forme de ribosomes pour le lymphocyte,
- un réticulum endoplasmique, pour le plasmocyte.

Les problèmes de transformation du lymphocyte sont d'actualité, en raison du développement des tentatives de greffe en clinique humaine :

- transformation in vitro, en présence de phyto-agglutinine (extraite de haricot) du petit lymphocyte en grande cellule blastique riche en ribosome (d'où basophilie cytoplasmique) : le petit lymphocyte sensibilisé in vitro par un antigène, se transforme in vitro en présence du même antigène (la tuberculine par exemple).
- transformation in vivo (réaction du greffon contre l'hôte, et réaction de l'hôte contre le greffon).

On étudie les problèmes de circulation du lymphocyte grâce au marquage des lymphocytes par incorporation au R.N.A. d'uridine marquée par le tritium radio-actif (injection par voie veineuse des lymphocytes marqués, et comptage radioactif, puis auto-radiographies sur les coupes histologiques) :

- le débit lymphocytaire dans le canal thoracique est dix fois supérieur au débit sanguin,

- la durée de vie des lymphocytes est variable, doù proposition de classification immunologique suivante :

. petit lymphocyte à vie courte (3 jours) : dans la moelle osseuse et thymus, totalisant 80% des lymphocytes,de ce type.

. petit lymphocyte à vie longue (3 mois à 10 ans) : dans les ganglions surtout, totalisant 80%.

. grands lymphocytes (3 semaines).

Mais le problème qui nous concerne, regarde le peuplement des organes lymphoïdes périphériques, et spécialement la colonisation de la population lymphoblastique durant l'ontogénèse:

1°) Peuplement des organes lymphoïdes périphériques

a) Considérons les ganglions lymphatiques (capsule, cortex, médullaire, des vaisseaux afférents périphériques se jetant dans les sinus sous capsullaires). Au cours d'une immunisation, ils augmentent de taille, car :

- il y a formation dans le cortex de très nombreux immunoblastes en division active,

- au 3è jour : formation des plasmocytes dans la médullaire,

- entre les 7è et 15 jours : présence d'anticorps décelable dans le sérum.

En l'absence d'une nouvelle immunisation, les ganglions reprennent leur taille normale.

b) Considérons la rate (capsule, pulpe blanche constituée de lymphocytes, pulpe rouge composée d'érythrocytes).
Au cours d'une immunisation, des centres germinatifs similaires apparaissent dans la pulpe blanche.

c) Considérons les plaques de Payer, disposées entre la musculeuse et l'épithélium du tube digestif : ce sont des amas de lymphocytes.

En cas d'immunisation par voie digestive, on voit apparaître de même, des centre germinatifs d'immunoblastes.

1°) Colonisation de la population lymphoblastique :

Quittons les organes périphériques lymphoïdes (Ganglions, Rate, Plaques de Payer) et remontons à l'origine de la migration de ces éléments immunologiquement immatures. La littérature décrit deux sortes d'organes lymphoïdes centraux :

a) La bourse de Fabricius, connue depuis longtemps chez les aviaires. C'est un diverticule lympho-épithélial situé dans la région iléo-caecale.

Elle a un rôle indéniable dans le développement de l'immunité. En effet, la bursectomie (androgène in ovo) entraine une hypo ou agamma-globulinémie, donc une baisse d'immunité humorale.

b) Le thymus qui involue comme la première glande, à l'âge adulte. Son rôle dans le développement de l'immunité est connu depuis longtemps. En effet, la thymectomie chez la souris nouveau-né, entraine une incapacité de rejeter les greffes de peau homologue (due à une lymphopénie) : il y a une baisse d'immunité cellulaire.

Il est intéressant de noter qu'on connaît l'équivalent de la bourse de Fabricius chez un mammifère (le sacculus rotondus chez le lapin).

Chez l'Homme, on ne connaît pas son équivalent. On a émis l'hypothèse qu'il s'agit de l'appendice ou des amygdales. Les arguments tirés de la pathologie humaine, laissent supposer qu'il y a en effet une double population lymphoblastique. On connaît en clinique :

- des malades agamma-globulinémiques, avec déficit immunitaire de type humoral, sans atteinte de l'immunité de type cellulaire,
- et des malades qui présentent un déficit d'immunité cellulaire sans atteinte de l'immunité humorale.

III - PREMIERE SECRETION DE BETA-1-C THYMO ET BURSO DEPENDANTE. DISCUSSION DES DEUX THEORIES : " COLONISATION HUMORALE " ET " COLONISATION CELLULAIRE ".

La moelle osseuse donne d'une part les séries granulocytaire, mégacaryocytaire, érythrocytaire, et d'autre part : la cellule lymphoblastique. Celle-ci présente :

1°) une burso-dépendance, secrétant la Bêta-1-C dès le 12è jour après l'incubation chez le poulet. Cette lignée secrétant la Bêta-1-C comporte l'antigène (1). Elle augmente rapidement, mais au-delà du 51è jour, elle est pratiquement constante jusqu'à l'involution de la bourse;

2°) une thymo-dépendance, secrétant la Bêta-1-C dès le 17è jour après l'incubation. Cette lignée, secrétant aussi la Bêta-1-C, comporte deux antigènes, dont un est commun avec la bourse de Fabricius. Elle augmente très rapidement, dans un facteur de 8x 10x 13x 18x respectivement à 1, 2, 3, 4 mois.

Actuellement, on sait que :

- la lignée burso-dépendante donne des plasmocytes, secrétant les différentes immuno-globulines : IgG, IgA, IgM;
- la lignée thymo-dépendante donne des lymphocytes à vie courte et longue, responsables de l'hypersensibilité retardée et du rejet des greffes.

En raison des échanges possibles entre les deux lignées durantleur circulation à travers les organes périphériques, certains auteurs estiment, qu'une division en deux lignées lymphocytaires complètement autonomes, serait exhaustive.

CONCLUSION

Nous avons proposé dans ce travail, une nouvelle ultra-microtechnique de dosage du complément total, rapide, précise et reproductible, à partir d'une seule goutte de sang.

Graĉe aux techniques d'immuno-électrophorèse, nous avons étudié sa fraction Bêta-1-C, avant son altération dûe au vieillissement.

En nous aidant des méthodes d'immuno-fluorescence exécutées sur coupes à congélation, nous avons localisé la fraction Bêta-1-C cellulaire chez l'embryon de poulet.

Pour identifier les lignées lymphoblastiques Bêta-1-C formatrices, nous nous sommes basés sur les méthodes d'immuno-absorption, ou de modification chimique de site antigénique.

Nous avons démontré :

- l'existence des premiers éléments lymphoblastiques Bêta-1-C formateurs dans la Bourse de Fabricius (caractérisation de l'antigène "1".)
- l'existence des premiers éléments lymphoblastiques Bêta-1-C formateurs "similaires" dans le thymus (caractérisation de l'antigène "1" et de l'antigène "2").

Nous avons fait une étude comparative des populations lymphoblastiques Bêta-1-C formatrices dans le thymus et dans la bourse de Fabricius, depuis leur apparition dans l'ontogénèse jusqu'au commencement de leur involution, chez l'embryon de poulet ; il s'est avéré que :

1) il n'y a pas de lymphoblastes Bêta-1-C formateurs avant le 17è jour d'incubation pour le thymus, alors que pour la bourse de Fabricius la formation de Bêta-1-C est plus précoce : dès le 12è jour d'incubation;

2) la Bêta-1-C fabricienne augmente lentement jusqu'à l'éclosion, puis rapidement du 21è jour au 51è jour (4 fois la population du 21è jour), puis lentement du 51è au 141è jour (5 fois la population du 21è jour);

3) la Bêta-1-C thymique augmente très rapidement du 17è au 21è jour (avec un facteur de 4x) ; elle s'accroît plus rapidement encore
avec un facteur de 8x, à la fin du 1er mois
avec un facteur de 10x, à la fin du 2è mois
avec un facteur de 13x, à la fin du 3è mois
avec un facteur de 18x, à la fin du 4è mois.

Les recherches récentes ont montré l'apaprition des premiers anticorps au niveau de la Bourse de Fabricius et du thymus, à des stades plus tardifs que ceux de la formation de la Bêta-1-C, déterminés pas nos mesures.

La Bêta-1-C globuline, fraction la plus importante du complément, précède donc la formation des premiers anticorps.

Ces résultats sont en accord avec les conceptions actuelles sur les problèmes de migration des éléments lymphoblastiques burso-dépendants responsables de l'immunité humorale, et des éléments lymphoblastiques thymo-dépendants responsables de l'immunité cellulaire

- BIBLIOGRAPHIE -

BIBLIOGRAPHIE.

ALBERTY R.A. et BALDWIN R.L.-
I95I Mathematical theory of immune Hemolysis. j. immunol., 66, (I95I), 725.

ANDRE. A.-
I967 Conceptions actuelles sur le complément sérique. Compte rendu de la scéance de la société Nationale de Transfusion Sanguine. X, 3, 236 (Tableau I).

ARVY. L.-
I963 Contribution à la Connaissance du Thymus et de la Bourse de Fabricius. Nouvelle Revue Française d' Hématologie. I963, 3, 663-702.

BECKER. E.L.-
I959 Concerning the Mecanism of Complement Action. IV. The Properties of Activated First Component of Guinea Pig Complement. j. immunol. (I959) 82. 43.

BECKER. E.L.-
I960 Concerning the Mecanism of Complement Action. V. The early steps in immune hemolysis. j. imm., I960, 84, 299.

BORDET. J.-
I939 Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. I939 dernière édition, Masson, Paris.

BORSOS. J., RAPP. H.J. and MAYER. M.M.-
I96I Studies on The Second Component of Complement. I: The Reaction between EAC'I, 4 and C'2: Evidence on The Single Site Mechanism of Immune Hemolysis and Determination of C'2 on a Molecular Basis. j. imm. U.S.A., I96I, 87, 3, 3IO-325.

BORSOS. J. and RAPP. H.J.-
I965 Estimation of Molecular Size of Complement Components by Sephadex Chromatography. j. of Immunology, I965, 94, 4, 5IO.

BRAND.-
I907 Cité par Fasquelle. R. dans: Eléments d' Immunologie Générale. Masson Edit. Paris I965. (2ème Edit.) Page 29.

BRECY. H., ANDRE. A. et HARTMANN. L. -
I967 Dosage de l'activité complémentaire globale d'un sérum et des 4 fractions: C'I, C'2, C'3, C'4. Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol., I967, XII, IO25.

BUCHNER. H.- Veber die nähere Natur der baKterientötenden
I889 Substanz im Blutserum (I). Zentralblatt für Bacteriologie und ParasitenKunde, I889, 6, 56I.

BUCHNER. H.- Veber die BaKterientötende Wirtung des
I889 zellenfreien Blutserums (I) Zeutralblatt für BaKteriologie und ParasitenKunde, I889, 25, 8I7-823.

CARPENTER. C.B., GILL. T.J.-
I966 Effect of mercaptans and other agents on The human complement component bêta I C- globulin. Immunol., I966, IO, 355.

CEBRA. J.I. and GOLDSTEIN. G.-
I965 Chromatographic Purification of Tetramethylrhodamine. Immune Globulin Conjugates and Their Use in the Cellular Localization of Rabbit gamma-Globulin Polypeptide Chains. J. Immunolog. I965, 95, 230.

CERNOVODEANU. P. et HENRI. V.-
I906 Activation du pouvoir hémolytique de certains sérums par les sels de magnésium. C.R. Soc. Biol., I906, 60, 57I.

COONS. A.H., CREECH. H.J., JONES. R.N.-
I94I Immunological properties of an antibody Containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. (New-York.), I94I, 47, 200-202.

COONS. A.H. et KAPLAN. M.H.-
I950 Localization of antigen in Tissue Cells. Improvments in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med., I950, 9I, I-I3.

DA COSTA CRUZ. J. and DE AZEVEDO PENNA. A.-
I932 Constitution of Alexin and Mechanism of Specific Haemolysis. Mem. inst. Praldo Cruz, I932, 26, I42.

DAY. N.K.B., PICKERING. R.J., GEWURZ. H., GOOD. R.A.-
I969 Ontogenic development of the Complement system. Immunology. I969, I6, 3, 3I9-326.

DAY. N.K., GEWURZ. H., PICKERING. R.J., GOOD. R.A.-
I970 Ontogenic development of C'Iq synthesis in the Piglet. J.Immunol. I970, I04, 5, I3I6-I3I9.

DAY. N.K., GOOD. R.A., FINSTAD. J., GEWURZ. H.-
I970 Interactions between endotoxic lipopolysaccharides and The Complement System in The sera of lower Vertebrates. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. I970, I33, 4, I397-I40I.

DMITRIEVA. H.W.- Bull. Biol. Med. Exp. U.S.S.R.,
I939 I939, 8, 35.

EHRLICH. P. et MORGENROTH. J.-
I900 Veber Haemolysin, dritte Mitteil. Berl. Klin. Wchschr. I900, 37, 453.

FERRATA. A.- Die UnwirKsamKeit der Komplexen
I907 Haemolysine in salzfreien Lösungen und ihre Ursache. Berl. Klin. Wchschr. I907, 44, 366.

FASQUELLE. R., BARBIER. P., DAGUET. G., GOULLET. P.H.-
I965 a- Eléments d' Imunologie générale. Masson. Paris. 2ème Edit. I965. Pages 26 et 27.

FASQUELLE. R., BARBIER. P., DAGUET. G., GOULET. P.H.-
I965 b- Eléments d' Immunologie générale. Masson. Paris. 2ème Edit. I965. Pages 3I-32.

GORDON. J., WHITEHEAD. H.R., WORMALL.-
I926 The action of ammonia on Complement: The Fourth Component. Biochem. J., I926, 20, I028.

GRABAR. P. et BURTIN. P.-
I960 Analyse immuno-électro-phorétique. Masson et Cie. Paris. I960.

HENRY. V.- Etude de la loi de la vitesse de l'hémolyse
I905 des hématies de poulet par le sérum de chien. C.R. Soc. Biol., 57, (I905), 37.

HOOK., SNYDERMAN. R., MERGENHAGEN. S.E.-
I970 Consumption of Hamster Complement by bacterial endotoxin. J.immunol., I970, I05, I, 268-270.

JANSEN. J.A.-
1969 A specific inactivator of mammalian C'4 isolated from nurse shark (gingliostoma Cirratum) serum J. Exp. Med. 1969, 130, 2, 217-241.

JOLLY. J.-
1913 L'involution physiologique de la Bourse de Fabricius et ses relations avec l'apparition de la maturité sexuelle. C.R. Soc; Biol., 1913, 75, 638.

JOLLY. J.-
1915 La Bourse de Fabricius et les organes lympho-épithéliaux. Arch. Anat. Micro. 1915, 16, 363-547. (Page 385 et figures I à 4; planche H.T XV).

KABAT. E.A. and MAYER. M.M.-
1961 a- Complement and Complement Fixation. Experimental immunochemistry. 2nd edition, 1961. Charles C Thomas publisher SPRINGFIELD. ILLINOIS.

KABAT. E.A. and MAYER. M.M.-
1961 b- Complement and Complement Fixation. Experimental immunochemistry. 1961, 2nd edition, SPRINGFIELD, ILLINOIS, C.C. Thomas Publisher.p. 209.

KINCADE. P.W.- COOPPER . M.D.-
1971 Development and Distribution of Immunoglobulin - containing calls in the chicken. J. Immunol., 1971, 106, 371-382.

KLEIN. P.G.-
1960 Studies on immune hemolysis : Preparation of a stable and leghly reactive complex of sensitized erythrocytes and The First Component of Complement EAC'I. Inactivation of Cell fixed C'I by some Complements reagents. J. Exp. Med., 1960, III, 77.

KLEMPERER. M.R., GOTOFF. S.P., ALPER. C., LEVIN. A.J. et ROSEN. F.S.-
1965 Estimation of the serum bêta-I-C Globulin concentration. Relation to the serum hemolytic Complement Titer. Pediatrics, 35, (1965), 765.

KOHLER. P.F. et MULLER. EBERHARD. H.J.-
1967 J. Immunol., 1967, 99, 1211.

LANDOIS.-
1875 Cité par Fasquelle. R. dans "Eléments d'Immunologie Générale". Masson Edit. Paris 1965. 2ème édition, page 25.

LAPORTE. R., DELOOZE L.H. and SILHARD. R.-
1955 Contribution à l'étude du Complément. Inactivation spontanée dans les conditions de l'hémolyse, action protectrice des ions Calcium. Aun. Inst. Pasteur, 1955, 89, 16.

LAPORTE. R., DELOOZE. L.H. and SILHARD. R.-
1957 Contribution à l'étude du Complément II. Premier stade de l'action hémolytique du Complément. Ann. Inst. Pasteur., 1957, 92, 15.

LEPOW. I.H., PILLMER. L. and RATNOFF. O.D.-
I953 The influence of Calcium Ions on The inactivation of human Complement and its Components by Plasmin. J.Exp., 98, 277. I953.

LEPOW. I.H., RATNOFF. O.D., ROSEN. F.S. and PILLMER. L.-
I956 Observations on a proesterase associated with partially purified first Component of human Complement (C'I). Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., I956, 92, 32.

LEPOW. I.H., RATNOFF. O.D. and LEVY. R.L.-
I958 Activation of a Proesterase Associated with partially purified First Component of Human Complement. J. Exp. Med., I07, 45I, I958.

LEPOW. I.H.- In "Mechanisms of Hypersensitivity". J. H. Lo Crypo
I959 G.A. and Clase M.W. Little Brown and Co., Boston I959, p.267.

LEPOW. I.H., NAFF. G.B. and PENSKY. J.-
I965 Mechanism of Activation of C'I and Inhibition of C'I. Esterase. Complement. Ciba Foundation Symposium. I965. J. and A. Churchill, LTD. LONDON, W.I.

LEPOW. I.H., TODD. E.W., SMINK. R.D., Jr and PENSKY. J.-
I965 Purification of the Second Component (C'2) of Human Complement. Inst.of Pathol., Western Reserve Univ., Cleveland, Ohio. Fed. Proc., I965, 24, 446.

LEVEY. R.H. and MEDAWAR. P.B.-
I966 Some experiments on the action of antilymphoid antisera. Ann. N.Y. Acad. Sci; I966, I29, I64.

MAYER. M.M., LEVINE. L.-
I954 Kinetics studies on immune hemolysis. I à VII. J.Immunol., I954, 72, 5II et 5I6.

MAYER. M.M.- Mechanism of Haemolysis by Complement.
I965 Complement. Ciba Foundation Symposium. I965. J. and A. Churchill, LTD. LONDON, W.I.

MAYER. M.M., SHIN. H.S., MILLER. J.A.-
I967 Fragmentation of guinea-pig Complement Components C'2 and C'3c. XV Colloque de Bruges. I967.

MAYER. M.M.- Highlights of Complement research during the past
I970 twenty-five years. Immunochemistry. I970, 7, 5, 485-496.

MORSE. J.H.- I967 Further evidence for macromolecular nature of human C'I. Nature, I967, 2I4, I85.

MULLER-EBERHARD. H.J., NILSSON. U. and ARONSSON. T.- I960 Isolation and Characterization of two bêtaI - glycoproteins of human serum. J. Exp. Med., I960, III, 20I.

MULLER-EBERHARD. H.J. and NILSSON. U.- I960 Relation of bêtaI - glycoprotein of human serum to the Complement system. J. Exp. Med., I960, III, 2I7.

MULLER-EBERHARD. H.J., BIRO. L.E.- I963 Isolation and description of The Fourth Component of human Complement. J. Exp. Med., I963, II8, 447.

MULLER-EBERHARD. H.J. and LEPOW. I.H.- I965 C'I Esterase Effect on Activity and Physicochemical Properties of The Fourth Component of Complement. J. Exp; Med., I965, I2I, 8I9-833.

MULLER-EBERHARD. H.J.- I965 Chemie der Komplement FaKtoren, dans: " Immunochemie " I5. Colloquium der Gesellschaft für physiol. Chemie, Springer, I965.

MULLER-EBERHARD. H.J.- I968 Chemistry and reaction mechanism of Complement. Advances in Immunology. N.Y. London. Academic Press. I968, 8, 22.

MULLER-EBERHARD. H.J.- I969 Annual Rev. Biochem., I969, 38, 389.

NELSON. R.A.- I967 Proteins of the Complement system and Their biological functions. XV Colloque de Bruges. I967. Page I07.

NGUYEN-TRONG. Thu.- I963 Les méthodes d'immuno-électrophorèse. Applications aux protéines cellulaires, chez les mammifères. Thèse II Doctorat ES-Sciences Naturelles - I963. p.8 et 9.

NILSSON. U.R. and MULLER-EBERHARD. H.J.- I965 Isolation of bêtaIF globulin from human serum and its characterization as the fifth Component of Complement. J. of Exp. Med., I965, I22, 277.

PFEIFFER. R. und ISSAEFF. R.-
I894 Veber die specifische Bedentung der cholera-immunität. Z; Hyg. infeKtionsKranKh., I894, I7, 355.

PILLEMER. L., ECKER. E.E., ONCLEY. J.L. and COHN. E.J.-
I94I Préparation et caractère physicochimique des Composants sériques protidiques du sérum. The preparation and physicochemical characterization of the serum protein Components of Complement. J. Exp. Med., I94I, 74, 297.

PILLEMER. L., SEIFTER. S., CHU. F. and ECKER. E.E.-
I942 Function of Components of Complement in Immune Hemolysis. J.Exp. Med., I942, 76, 93.

POLLEY. M.J. and MULLER-EBERHARD. H.J.-
I965 Isolation of the second Component and the effect of iodoacetamide on its activity. Fed. Proc., I965, 24, 446.

RAYNAUD. M., STAUB. A.M.-
I97I (a) Cours d' Immunologie générale et de Sérologie de l' Institut Pasteur. I97I, II, I55-I56. 2I2-2I3.

RITZ.- Cité par Fasquelle. R; dans: " Eléments d'Immunologie
I9I2 Générale ". Masson. Edit. Paris I965. (2ème Edit) Page 29.

ROULIER. P.- Sur une réaction de fixation du Complément (titré
I952 à 50 p. IOO d'hémolyse). Application à l'étude des courbes syphillimétriques (Rec. Trav. Inst. Nat. Hygiène, I952, 4, 823.

SANDOR. G., ORLEY. C., KRAUSS. W. et KORACH. S.-
I967 Immunosérums correspondant à des composants proteidiques individuels du serum humain. Leur application à l'immunochimie par la méthode de diffusion radiale. Ann. Inst. Pasteur., I967, II2, 747.

SCHMID. D.O. and THEIN. P.-
I968 Leucocyte Antigens in Chickens. XIth European conference on animal blood groups and Biochemical polymorphisus.Warsaw, July 2nd-6th, I968. (I.N.R.A. I968 Paris. pages 407 à 4I0.)

SCHULTZE. H.E., HEIDE. K., HAUPT. H.-
I962 Darstellung und Eigenschaften Von bêta I A- globulin aus Humanserum. Klin. Wschr., I962, 40, 729.

SEIFTER. S., DOZOIS. T.F. and ECKER. E.E.-
I949 Immunochemical studies on human serum. The bactericidal properties of purified C'I and C'II of human Complements. J. Imm., I949, 49, 45.

SITOMER. Y., STROUD. R.M. and MAYER. M.M.-
I966 Reversible Adsorption of C'2 by EAC'4: role of Mg^{2+}, Enumeration of Competent SAC'4. Two step Nature of C'2a Fixation and Estimation of its Efficiency. Immunochemistry, I966, 3, 57-69.

SMITHIES. O.-
I955 Zone electrophoresis in starch gel: group variation in the serum proteins in normal humans. Biochem. J., I955, 6I, 629.

SOULIER. J.P.-
I956 Complément et proderdine. Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol., I956, I, 443.

STEINBUCK. M., QUENTIN. M., PEJAUDIER. L.-
I963 A simple technique for the isolation of bêta IC (bêta IA)- globulin. Nature, I963, 200, 262.

STEINBUCK. M., LOEB. J.-
I96I Isolation of an alpha 2- globulin from human plasma. Nature, I96I, I92, II96.

STEINBUCK. M.-
I964 Isolement de la bêta IC- globuline et étude de sa transformation en bêta IA- globuline. Vox Sanguinis, I964, 9, 96.

STEINBUCK. M.-
I967 La biochimie du Complément. La bêta IC- globuline. Bulletin de la société nationale de Transfusion Sanguine. TRANSFUSION. PARIS. I967. X, 3, 259-26I.

SUKHOVA. Nina O.-
I968 Complement Activity of Blood Serum in Pigs. XIth European Conference on animal blood groups and Biochemical polymorphisus. Warsaw, July 2nd-6th, I968 (Paris I968 I.N.R.A. pages 255-258.)

UENO. S.-
I938 JAP.J. med. Sci., VII, Social Med. and Hyg., I938, 2, 20I, 225.

VARGUES. R.-
I967 (a) Le dosage du Complément. Transfusion. T: X n°3. I967, page 285.

VARGUES. R.-
I967 (b) Le dosage du Complément. Transfusion. T. X. n°3. I967., page 284.

VARGUES. R. et AUDRAN. R.-
I962 (c) Proposition d'une définition non arbitraire de l'unité de complément. Rev. Franç. Et Clin. et Biol., I962, 7, II26.

VARGUES. R.- Le dosage du Complément.- Transfusion.
I967 (d) T.X. N°3- I967., page 279.

VARGUES. R. et AUDRAN. R.-
I962 (e) Proposition d'une définition non arbitraire de l'unité de Complément. Rev. Franç. et Clin. et Biol., I962, 7, II27.

VARGUES. R.- Le dosage du Complément. Transfusion.
I967 (f) T.X. N°3.- I967., page 288.

WEST. C.D., DAVIS. N.C., FORRISTAL. J.-
I966 Antigenic determinants of human bêta IC - and bêta IG- globulins. J. Immunol., I966, 96, 650.

WHITEHEAD. H.R., GORDON. J. and WORMALL.-
I925 The " Third Component " a heat-stabble factor of complement. Biochem. J., I925, I9, 6I8.

YACHNIN. S., ROSENBLUM. D. and CHATMAN. D.-
I964 Biologic properties of polynucleotides. V. Studies on the inhibition of the first Component of Complement by polyinosinic acid: the interaction with C'Iq. J.Immunol., I964, 93, 540.

ZIMMER. M.J.- Aspects immunoélectrophorétiques du Complément.
I960 Bull. Soc. Franç. Derm. syph., I960, 67, 6I6.

ZIMMER. M.J.- Contribution à l'étude de la déviation du Complément
I96I sur un immun-précipité. Bull. Soc. Franç. Derm. Syph., I96I, 68, 9047.

Académie de Paris

UNIVERSITE de PARIS VI
1, Quai Saint Bernard - Paris 5

SERVICE DE LA SCOLARITE
au des Enseignements du 3e Cycle

Tél. 336.25.25 et 325.12.21

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : D'UNIVERSITE . . . . . .

THESE DE : . . . . . .

NOM : . . ROBILLIART . . . . . .

Prénoms : . . Yves . . . . . .

né le 23 Septembre 1937 à . . LILLE . . Nord . . . . . Dépt : . . .

1ère THESE : . . Recherches cytophysiologiques sur le complément et sur la formation de sa fraction beta 1-C chez l'embryon de Poulet.

. . . . . .

. . . . . .

. . . . . .

2e THESE (Propositions faites par l'Université) : . Conceptions actuelles sur le rôle de la bourse de Fabricius. . . . . .

. . . . . .

. . . . . .

ACADEMIE DE PARIS
UNIVERSITE
PARIS

Vu et Approuvé

PARIS, le . . 13 Janvier 1972

Le Président

de l'Université de PARIS VI

A. HERPIN